



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE METALES EN PROPÓLEO Y SUS
EXTRACTOS ETANÓLICOS POR ESPECTROMETRÍA
DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA DE
MICROONDAS**

TESIS

PRESENTADA POR

PATRICIA ESMERALDA VÁZQUEZ QUINTAL

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UA
UNIV
AU
DE

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE METALES EN PROPÓLEO
EXTRACTOS ETANÓLICOS POR ESPECTROM
DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA DE
MICROONDAS**

TESIS

PRESENTADA POR

PATRICIA ESMERALDA VÁZQUEZ QUINTAL

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 12 de noviembre de 2018
Oficio Num.: PICQB/506/2018

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis “**Determinación de metales en propóleo y sus extractos etanólicos por espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas**” presentada por Patricia Esmeralda Vázquez Quintal, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis

Dr. David Muñoz Rodríguez

Dr. Jesús Alberto Barrón Zambrano

Sinodales:

Dra. Tania Isolina Coral Martínez

Firmas

Dr. Manuel Hernán Barceló Quintal

MI. Jazmín Salett Novelo Castilla

ATENTAMENTE
“LUZ, CIENCIA Y VERDAD”

DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo
MRSC

Página Web: <http://www.picqb.uady.mx>
E-mail: picqb@correo.uady.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su aliento en este largo camino.

A mis asesores, Dr. David Muñoz y Dr. Jesús Barrón, por brindarme mucho de su sabiduría.

A la Dra. Tania Coral, el Dr. Manuel Barceló y la MI Salett Novelo, por sus valiosas aportaciones.

A Mariela Lope, Valeria Mota, Landy Lara, Juan Manuel Puc y Armando Molina por su ayuda técnica y moral.

A todos ellos por su paciencia, consejos e infinito apoyo. De otra forma no sería posible.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. David Muñoz Rodríguez y el Dr. Jesús Alberto Barrón Zambrano, con el apoyo de una beca concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)

RESUMEN

El propóleo es un producto de la colmena elaborado por las abejas obreras a partir de diversas partes de las plantas. Lo utilizan para sellar su panal, evitar la contaminación microbiana, etc. Su compleja composición química le confiere propiedades benéficas y se aprovecha con fines medicinales, terapéuticos y nutricionales. Se emplea en forma cruda y como extractos etanólicos (tinturas).

Es necesario desarrollar métodos adecuados para conocer la cantidad de elementos esenciales y contaminantes en el propóleo y sus tinturas. Los métodos existentes se basan en técnicas caras, riesgosas y/o restringidas al uso de equipos especializados. Además, es importante contar con estudios de propóleo mexicano, ya que representa un área de diversificación para los apicultores nacionales. Una alternativa innovadora, sencilla, segura y rápida para el análisis de rutina de propóleo crudo y sus tinturas es la Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma de Microondas (MP-AES, por sus siglas en inglés).

En este trabajo se desarrolló y validó una metodología, basada en MP-AES, para determinar la concentración de Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr y Zn en propóleo crudo, tinturas y el residuo sólido. El método fue selectivo, sensible, preciso y exacto para la mayoría de los elementos, y se aplicó en el análisis de 23 tinturas de propóleo comerciales. Se observó que la transferencia de los elementos del propóleo a la tintura fue pobre. El contenido de las tinturas comerciales fue similar a la tintura control.

Se evaluó el efecto del contenido de etanol en la pendiente y en el intercepto de las curvas de calibración, y se desarrolló y validó un método para determinar el contenido de etanol. El método se aplicó a las 23 tinturas comerciales. El etanol (hasta 80% v/v) aumentó la sensibilidad y disminuyó los límites de detección y cuantificación. Las curvas con 70, 80 y 90% de etanol no difirieron significativamente. El contenido de etanol promedio en las tinturas comerciales fue 80% v/v.

ABSTRACT

Propolis is a bee product made by worker bees from various parts of the plants. Bees use it to seal their honeycomb, avoid microbial contamination, etc. Its complex chemical composition gives it beneficial properties and is used for medicinal, therapeutic and nutritional purposes. Propolis is used in crude form and as ethanolic extracts (tinctures).

It is necessary to develop adequate methods to know the amount of essential and contaminants elements in propolis and tinctures. The existing methods are based on expensive, risky and/or restricted techniques to the use of specialized equipment. In addition, it is important to have studies of Mexican propolis, since it represents an area of diversification for national beekeepers. An innovative, simple, safe and fast alternative for the routine analysis of crude propolis and tinctures is Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry (MP-AES).

In this work was developed and validated a methodology, based on MP-AES, to determine concentration of Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr and Zn in raw propolis, tincture and solid residue. The method was selective, sensitive, precise and accurate for most of the elements, and was applied in analysis of 23 commercial propolis tinctures. It was observed that transfer of propolis elements to the tincture was poor. Content of the commercial tinctures was similar to the control tincture.

Effect of ethanol content on slope and intercept of calibration curves was evaluated, and a method for determining the ethanol content was developed and validated. The method was applied to the 23 commercial tinctures. Ethanol (up to 80% v/v) increased sensitivity and decreased limits of detection and quantification. The calibration curves with 70, 80 and 90% ethanol did not differ significantly. Average ethanol content in the commercial tinctures was 80% v/v.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Características físicas y funciones del propóleo	3
Composición química del propóleo	3
Propiedades y usos del propóleo.....	4
Contaminación del propóleo con metales	4
Determinación de metales en propóleo.....	6
Espectrometría de emisión con plasma de microondas	9
Validación de métodos analíticos.....	13
HIPÓTESIS.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Metodología general del proyecto.....	21
Muestras.....	22
Propóleo crudo.....	22
Tinturas de propóleo comerciales.....	23
Cuantificación de metales por MP-AES	25
Propóleo crudo sin fortificar.....	25
Fortificación de propóleo crudo	26
Preparación de tinturas control.....	26
Fortificación de tinturas control.....	27
Digestión de propóleo crudo y residuos sólidos de extracción.....	27
Análisis espectrométrico	28
Condiciones instrumentales.....	28
Construcción de curvas de calibración externas	30
Efecto del contenido de etanol en la sensibilidad.....	31
Validación del método	31
Análisis de muestras reales.....	34
Cuantificación de etanol por reducción de Cr ⁶⁺ (método indirecto).....	34

Preparación de tinturas control.....	34
Pretratamiento de tinturas comerciales	34
Preparación de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), 3.3 mmol L ⁻¹	34
Preparación de ácido perclórico (HClO ₄), 7 mol L ⁻¹	34
Preparación de blanco acuoso	35
Preparación de blancos al vacío y liofilizados	35
Cuantificación de etanol en tinturas y blancos por espectrofotometría UV-vis	35
Análisis estadístico: preparación de blancos	36
Validación del método	36
Análisis de muestras reales.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Cuantificación de elementos en propóleo, tinturas y residuo sólido por MP-AES.....	39
Condiciones instrumentales	39
Validación del método	39
Confirmación de identidad	39
Selectividad	41
Sensibilidad	47
Efecto del contenido de etanol en la sensibilidad.....	49
LoD y LoQ instrumentales	51
Rango lineal y de trabajo	55
Exactitud y precisión (repetibilidad)	57
Determinación de metales.....	59
Propóleo crudo, tintura control, residuo sólido	59
Determinación de etanol en tinturas comerciales.....	67
CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS.....	85
ANEXOS	95
Comparación de curvas de calibración	95
Metodología (análisis estadísticos).....	95
Resultados por elemento	96
Aluminio (Al)	96
Arsénico (As)	96
Bario (Ba)	97

Cadmio (Cd)	97
Calcio (Ca).....	98
Cobalto (Co)	98
Cromo (Cr).....	99
Cobre (Cu).....	99
Hierro (Fe)	100
Potasio (K).....	100
Magnesio (Mg).....	101
Manganeso (Mn)	101
Sodio (Na)	102
Níquel (Ni)	102
Plomo (Pb)	103
Selenio (Se).....	104
Estroncio (Sr).....	104
Zinc (Zn)	105

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto de la colmena elaborado a base de materiales naturales recolectados de diversas partes de las plantas. Es utilizado por las abejas con distintos fines, entre los que destacan: fortalecer el panal, evitar el crecimiento microbiano, etc. Posee una composición química compleja que le confiere diversas propiedades benéficas que hacen que se aproveche, principalmente, con fines medicinales desde tiempos ancestrales. Actualmente, goza de una alta popularidad como remedio curativo y suplemento nutricional. Se puede emplear en su forma cruda o también como tinturas que conservan prácticamente todas las propiedades del propóleo crudo.

Dada la importancia del propóleo en el sector alimentario y de productos naturales, es imperativo contar con métodos adecuados que permitan conocer la cantidad de metales esenciales y tóxicos presentes en el propóleo, pues dicha composición tiene relación directa con su calidad e inocuidad. Es importante mencionar que la literatura existente sobre la determinación de metales, esenciales y tóxicos, en el propóleo producido en México es escasa; por lo que la aplicación del método que se propone al propóleo mexicano y sus productos derivados aumentaría sus niveles de calidad y, en consecuencia, tendría un impacto positivo en la economía de los apicultores mexicanos.

En este trabajo se desarrolló y validó una metodología, basada en la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES), para determinar la cantidad de metales presentes en el propóleo crudo, sus tinturas, así como en el material residual de la extracción. La técnica propuesta ha demostrado ser rápida, segura, barata y lo suficientemente sensible para utilizarse en análisis de rutina.

Por otra parte, el contenido de etanol en las tinturas comerciales varía de una muestra a otra y, en la mayoría de los casos, no se reporta por el fabricante. Lo anterior representa un problema pues la presencia de etanol tiene un efecto de intensificación de la señal de emisión atómica de la mayoría de los elementos analizados. Por lo tanto, en este trabajo también se determinó la cantidad de etanol en las muestras de tinturas comerciales, mediante la adaptación y validación de una metodología basada en la oxidación de etanol con dicromato de potasio. Además, se compararon estadísticamente curvas de calibración preparadas a diferentes concentraciones de etanol. Lo anterior se hizo con el objetivo de establecer una concentración de etanol óptima en la cual realizar el análisis elemental de las tinturas.

ANTECEDENTES

Características físicas y funciones del propóleo

El propóleo, conocido como “pegamento apícola” es un material oscuro proveniente de sustancias resinosas, pegajosas y balsámicas, recolectado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*, L.) de los botones, flores y exudados de las plantas y que se mezclan con excreciones salivares, cera y polen (Burdock, 1998; Bankova, De Castro, & Marcucci, 2000; Sforcin J. M., 2007).

El término “propóleos” se deriva de los vocablos griegos *pro*: “en defensa” y *polis*: “ciudad”, reflejando su importancia para las abejas, debido a que éstas lo utilizan para sellar las paredes y fortalecer los bordes de sus colmenas, embalsamar a los invasores muertos evitando así la contaminación por microorganismo patógenos e inhibir el brote de semillas y granos (Bankova et al., 2000; Sforcin J. M., 2007; Cvek, et al., 2007).

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAGGAN-2017 que establece las especificaciones para la producción y el procesamiento del propóleo da el nombre genérico de propóleo a las “sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2017).

Composición química del propóleo

La composición química del propóleo es extremadamente compleja y variada ya que es afectada por las condiciones climáticas y el tipo de flora apícola. Dependiendo del origen, el propóleo puede contener más de 400 sustancias químicas diferentes. Éstas son reflejo del ambiente ya que el propóleo es elaborado a partir de productos naturales y, al mismo tiempo, está expuesto a los alrededores (Bonvehí y Bermejo, 2013).

En promedio, el 55% lo conforman resinas y bálsamos, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (Bonheví y Coll, 2000); 30% de cera, 10% de aceites volátiles y 5% de polen. Contiene también algunos ácidos orgánicos y una cantidad considerable de elementos químicos, incluyendo calcio (Ca), cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn). Las vitaminas B1, B2, B6, C y E, el ácido nicotínico, pantoténico y los aminoácidos también están presentes (Castaldo y Capasso, 2002; Bankova et al., 2000; Buriol et al., 2009).

Propiedades y usos del propóleo

Los humanos han utilizado el propóleo como un remedio para curar heridas, quemaduras e infecciones de piel y garganta, entre otras aplicaciones; así como en suplementos dietéticos y cosméticos. Actualmente, es muy popular en la medicina tradicional y alternativa (Król, Bankova, Sforcin, y Szliszka, 2013). Debido a lo anterior, el propóleo se ha sometido a intensos estudios farmacológicos y químicos en los últimos 40 años (Sforcin y Bankova, 2011). Muchos estudios confirman su actividad antibacterial, antifúngica, antiviral, hepatoprotectora, inmunomoduladora, antitumoral, quimiopreventiva, antiparasitaria, antiinflamatoria y antioxidante (Burdock, 1998; Kujumgiev et al., 1999; Marcucci et al., 2001; Sforcin y Bankova, 2011; Choi et al., 2006; Christov, Trusheva, Popova, Bankova, y Bertrand, 2006; Mohammadzadeh, Sharriatpanahi, Hamedi, y Amanzadeh, 2007; Seidel, Peyfoon, Watson, y Fearnley, 2008; Sforcin J. M., 2007).

Gracias a sus propiedades antibióticas y antifúngicas, el propóleo es utilizado como ingrediente fitoquímico en alimentos funcionales a niveles que pueden conferir beneficios a la salud (International Food Information Service, 2005) y previenen padecimientos como inflamación, enfermedades del corazón, diabetes, envejecimiento y cáncer (Castaldo y Capasso, 2002; Bankova et al., 2000; Banskota, Tezuka, y Kadota, 2001; Buriol et al., 2009; Sforcin y Bankova, 2011).

Esto ha conducido a un considerable interés de los consumidores en productos que contienen propóleo comercializados por tiendas de alimentos saludables, y se ha puntualizado en su potencial para el desarrollo de nuevas drogas (Bankova, 2005). Adicionalmente, se han propuesto otros usos como conservador químico en productos cárnicos y como germicida e insecticida para alimentos empacados (Tosi, Re, Ortega, y Cazzoli, 2007).

En particular, las tinturas son mundialmente utilizados por sus propiedades terapéuticas (Sforcin y Bankova, 2011; Król et al., 2013). Se han empleado en un amplio rango de aplicaciones nutraceuticas y cosméticas, como productos de higiene dental, cremas curativas, jabones antibacteriales, suplementos reforzadores del sistema inmunológico y preparaciones antireumáticas. Los ingredientes activos se han identificado como flavonoides y derivados del ácido cafeico (Burdock, 1998).

Contaminación del propóleo con metales

Algunos autores indican que las abejas y sus productos pueden ser utilizados como indicadores biológicos de la contaminación ambiental que está presente en el área donde vuelan (Burdock, 1998; Perugini, Manera, Grotta, Abete, y Tarasco, 2011). La contaminación del propóleo y, en consecuencia, de sus tinturas; con metales tóxicos

puede derivarse de la contaminación de la atmósfera y las plantas, del tratamiento con plaguicidas, del método de recolección, del equipo de manufactura, entre otras razones (Bogdanov, Contaminants of bee products, 2006).

El aire y el suelo contienen metales pesados que contaminan la colonia de abejas y sus productos. El plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y arsénico (As) son los principales contaminantes. Diversas publicaciones científicas muestran trazas de contaminación con Pb y Cd en productos de colmena, específicamente en miel, cera, pan de abeja, polen y propóleo (Kalbande, Dhase, Chaudhari, y Wate, 2008; Madras-Majewska y Jasinski, 2003).

El Pb en el propóleo puede originarse del método de recolección por raspado, debido a que con esta técnica es posible que se acarreen contaminantes provenientes de las pinturas utilizadas por los apicultores en las colmenas. Otra fuente de Pb son los implementos metálicos empleados en la colmena, como los clavos, los alambres de los bastidores, los excluidores de reina metálicos, entre otros (Sales, y otros, 2006). El Pb causa efectos neurológicos, psicológicos y conductuales en niños en función de los niveles de exposición (Bogdanov, Contaminants of bee products, 2006).

Por otra parte, el Cd, que es originado en la industria metalúrgica e incineradores, es absorbido por las plantas desde el suelo (Bogdanov, Contaminants of bee products, 2006). A este elemento se le ha relacionado con la formación de tumores (Roman, Madras-Majewska, y Popiela-Pleban, 2011a).

El As es un elemento ubicuo y tóxico que puede ser encontrado en rocas, agua, suelo y plantas e incluso en el aire. (Bonvehí y Bermejo, 2013). Sus efectos tóxicos abarcan irritación del estómago, intestinos y pulmones; cambios en la piel, cáncer, infertilidad y daño cardíaco y cerebral, entre otros (Carrión Samaniego, 2009; Castro, 2006).

Se ha establecido una ingesta semanal provisional tolerable (PTWI, por sus siglas en inglés) de los elementos tóxicos Pb, Cd y As en 25, 7 y 15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal, respectivamente (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2007). Estos elementos son persistentes, permaneciendo en el ambiente por largos periodos sin cambios en sus propiedades tóxicas.

Los metales como el cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) o zinc (Zn), entre otros, son esenciales para los humanos y juegan un rol importante en un gran número de procesos bioquímicos. Sin embargo, a altas dosis, estos elementos pueden ser tóxicos para los humanos. También, pueden causar una variedad de cambios indeseables en las preparaciones de propóleo durante su

formulación y almacenamiento. Entre los elementos traza, el Cr, Fe y Zn fueron los que se reportan más comúnmente en propóleo crudo (Bonvehí y Bermejo, 2013).

Cuando el propóleo está en contacto con superficies de acero inoxidable durante la cosecha, el procesamiento y/o su preparación para ser comercializado puede generar un contenido más alto de Cr, debido al efecto corrosivo de la acidez del propóleo. Esta acidez es producida por la posible presencia de algunos ácidos de bajo peso molecular (fundamentalmente ácido fosfórico) que son originados de la exudación de las plantas (Bankova, Christov, y Delgado, 1998).

Los contenedores galvanizados pueden ser una fuente importante de contaminación por Zn. Por otro lado, puede asumirse que los compuestos fenólicos presentes en el propóleo tienden a quelar metales como el Fe y el Cu, y catalizan reacciones químicas que originan radicales libres o quelatos de metales pesados. Incluso a niveles de unos cuantos miligramos por kilogramo, los complejos pueden formarse causando el desarrollo de colores (v.g. pigmento negro cuando el Fe se combina con compuestos fenólicos). De acuerdo con estos factores, el propóleo puede contener metales que pueden afectar significativamente las propiedades biológicas de los productos derivados (v.g. tinturas) (Bonvehí y Bermejo, 2013).

En resumen, el contenido de elementos tóxicos en el propóleo y sus tinturas es un bioindicador útil para el monitoreo de la contaminación y un importante parámetro de control de calidad de la seguridad sanitaria (Cvek et al., 2008).

Determinación de metales en propóleo

La información disponible actualmente sobre la composición de elementos traza en propóleo ha ido en aumento (tabla 1). Sin embargo, el conocimiento sobre la posible presencia de contaminantes (metales tóxicos) en este material sigue siendo limitado.

La espectrometría de absorción atómica con llama y con horno de grafito están todavía entre los métodos comúnmente utilizados para la determinación de Cu, Ni, Pb, Cd, Mo y Zn en muestras biológicas y alimenticias (Kulevanova, Stafilov, y Dorevski, 1995; Tuzen, Sari, y Soylak, 2004).

Sin embargo, uno de los avances más significativos en el análisis de elementos traza en las recientes décadas ha sido el desarrollo de una fuente de plasma para la atomización/excitación de las muestras. Como consecuencia, la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente y la espectrometría de masas con ionización por plasma acoplado inductivamente se han situado como las principales técnicas utilizadas para la determinación del contenido de elementos traza en propóleo y muestras similares. Otra técnica igualmente empleada es el análisis de activación de

neutrones (Cantarelli, Camiña, Pettenatic, Marchevskya, y Pelleranoa, 2011; Castaldo y Capasso, 2002; Conti y Botrè, 2001; Cvek et al., 2008; Gong, Luoa, Gong, Gao, y Xie, 2012).

Además, se ha reportado el uso de otras técnicas menos comunes como la espectrometría ultravioleta-visible, la polarografía de redisolución anódica, la voltamperometría de redisolución anódica con disco rotatorio y los biosensores electroquímicos (Sales et al., 2006; Baas; 2012; Bolio, 2013; San Román, 2012). La mayoría de los estudios reportados utilizan como técnica de digestión un programa en horno de microondas, aunque también se ha empleado la calcinación, la digestión ácida con presión y la digestión ácida en vaso abierto (tabla 1).

Tabla 1. Métodos de digestión y determinación de metales en propóleo.

Matriz	Origen	Elementos	Técnica de digestión	Técnica analítica	Referencia
Propóleo	Brasil	Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Zn	Ácida tradicional, microondas	ICP-OES	(Andrade et al., 2013)
Propóleo	México	Cd, Cu, Pb, Zn	Microondas	ASP	(Baas Dzul, 2012)
Propóleo	España	Ag, Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Zn	Microondas	ICP-AES, FAAS	(Bonvehí y Bermejo, 2013)
Propóleo	México	As, Hg	Microondas	HG-AAS, CV-AAS, ASV-EDR	(Bolio Gahona, 2013)
Propóleo	Argentina	Co, Cr, Fe, Rb, Sb, Sm, Zn	Calcinación	NAA	(Cantarelli et al., 2011)
Propóleo	Italia	Cd, Cr, Pb	Microondas	FAAS	(Conti y Botrè, 2001)
Propóleo, tinturas	Croacia	Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr, Zn	Microondas	ICP-AES	(Cvek, et al, 2008)

Tabla 1 (continuación). Métodos de digestión y determinación de metales en propóleo.

Matriz	Origen	Elementos	Técnica de digestión	Técnica analítica	Referencia
Propóleo	Moldavia	Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn	--	FAAS	(Ereimia y Dabija, 2007)
Propóleo (tabletas, cápsulas)	Polonia	As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Zn	Ácida con presión	ICP-MS	(Falcó, Llobet, Zareba, Krzysiak, y Domingo, 2005)
Propóleo	Brasil	Al, Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb, Zn	Ácida tradicional	FAAS, GF-AAS	(Finger, Kelte, Reyes, y Pércio, 2014)
Propóleo	Polonia	Cd, Fe, Mg, Ni, Pb, Zn	Ácida tradicional	FAAS	(Formicki, Greń, Stawarz, Zyśk, y Gał, 2013)
Propóleo	China	Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Zn	Microondas	ICP-AES	(Gong et al., 2012)
Propóleo	Chile y España	Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Ni, Pb, Zn	Ácida con presión	ICP-OES, ICP-MS	(González-Martín et al., 2015)
Propóleo	México	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn	Microondas	ICP-MS	(López Domínguez, 2012)
Propóleo	Polonia	Pb	Microondas	GF-AAS	(Madras-Majewska y Jasinski, 2003)
Tinturas	Brasil	Cd, Cr, Pb	--	FAAS	(Morgado Schmidt et al., 2014)
Propóleo	Polonia	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Microondas	ICP-AES	(Roman, et al., 2011a)
Propóleo	Polonia	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Microondas	ICP-AES	(Roman y Popiela-Pleban, 2012)

Tabla 1 (cont.). Métodos de digestión y determinación de metales en propóleo.

Matriz	Origen	Elementos	Técnica de digestión	Técnica analítica	Referencia
Propóleo	Argentina	Pb	Ácida tradicional	GF-AAS, UV-Vis	(Sales et al., 2006)
Propóleo	México	Cd ²⁺ , Pb ²⁺	Microondas	Biosensores electroquímicos	(San Román Ávila, 2012)
Propóleo (cápsulas) y tinturas	Polonia	Ag, Cr, Co, Na	--	NAA	(Scheller et al., 1989)

ASP, polarografía de redisolución anódica; ASV-EDR, voltamperometría de redisolución anódica con disco rotatorio; CV-AAS, espectrometría de absorción atómica con vapor frío; FAAS, espectrometría de absorción atómica con llama; GF-AAS, espectrometría de absorción atómica con horno de grafito; HG-AAS, espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros; ICP-AES, espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente; ICP-MS, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; ICP-OES; espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente; NAA, análisis por activación de neutrones; UV-Vis, espectrometría ultravioleta-visible (todos por sus siglas en inglés).

Espectrometría de emisión con plasma de microondas

En la espectrometría de emisión atómica de plasma, la muestra se introduce en el plasma donde es evaporada y dissociada en átomos y iones libres, que son excitados por el suministro de una energía adicional. Las fuentes de plasma se basan en descargas eléctricas de gas a presión atmosférica y alcanzan temperaturas superiores a los 5000 K. El estado excitado alcanzado es inestable y habrá una pérdida de energía que dará como resultado una emisión.

Los plasmas se clasifican en tres tipos (Santiago Rivas, 2007):

1. Plasmas acoplados por inducción (ICP).
2. Plasmas de corriente directa (DCP).
3. Plasmas inducidos por microondas (MIP).

Desde su desarrollo para uso comercial, la ICP-OES se convirtió en la técnica dominante para el análisis multielemental de muestras con niveles de analito en los órdenes de ppm y ppb. Sin embargo, al ser una técnica costosa, fue necesario contar con una técnica asequible que, al mismo tiempo, no se tradujera como una pérdida en sensibilidad.

La técnica que cumplió con dichas características fue el sistema basado en MIP, que por mucho tiempo funcionó como sistema de detección en cromatografía de gases. Los equipos comercializados actualmente son una modificación de estos primeros

modelos y la técnica se conoce como espectrometría de emisión con plasma de microondas (MP-AES).

El núcleo de esta tecnología es un imán de 2.5 GHz acoplado a un plasma de nitrógeno, el cual es formado utilizando aire y un generador de nitrógeno. Al utilizar el campo magnético más que el campo eléctrico para la excitación, se forma un plasma robusto que es capaz de manejar una concentración mayor de sólidos disueltos que los diseños previos. La guía de ondas de microondas concentra tanto el campo magnético axial como el eléctrico radial alrededor de la antorcha, creando un plasma convencional, lo que permite que un nebulizador concéntrico inerte tradicional y una cámara de nebulización de doble paso sean conectados a la antorcha.

El sistema óptico utiliza una configuración de visión axial, donde la emisión del plasma se dirige hacia un monocromador Czerny-Turner de escaneo rápido y 600 mm de longitud focal con un rango de longitud de onda de 178-780 nm. La rejilla holográfica del sistema ofrece una resolución de 0.050 nm. El sistema de detección está integrado por un detector con dispositivo de iluminación de fondo con carga acoplada (CCD). El detector es enfriado a 0°C utilizando un dispositivo termoeléctrico Peltier y recolecta las longitudes de onda de los analitos y el ruido de fondo, permitiendo así una corrección de ruido de fondo (Thomas, 2014).

La tabla 2 es un resumen de algunas características y parámetros de funcionamiento importantes de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para el análisis multielemental.

Tabla 2. Características y parámetros de funcionamiento de diversas técnicas espectroscópicas (Agilent Technologies, Inc., 2016).

Característica	AAS		MP-AES	ICP-OES	ICP-MS	
	FAAS	GF-AAS			SQ	QQQ
Límites de detección	100 ppb	10-100 ppt	10 ppb	100 ppt	< ppt	< ppt
Modo de medición	Secuencial	Secuencial	Secuencial	Simultáneo	Pseudo-simultáneo	Pseudo-simultáneo
Número máximo de muestras por día (elementos)	100-200 (~6)	50-100 (~2)	300-500 (~10)	2000-2500 (50+)	750-1000 (50+)	500-750 (50+)
Rango dinámico lineal.	3-4*	2-3*	4-5*	7-8*	10-11*	9*
Habilidad del operador requerida	Baja	Media	Muy baja	Media	Alta	Muy alta
Costo inicial	Muy bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto

AAS, espectrometría de absorción atómica; FAAS, espectrometría de absorción atómica con llama; GF-AAS, espectrometría de absorción atómica con horno de grafito; MP-AES, espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas; ICP-OES; espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente; ICP-MS, espectrometría de masas con ionización por plasma acoplado inductivamente; SQ, cuadrupolo simple; QQQ, triple cuadrupolo (todos por sus siglas en inglés).

*Órdenes de magnitud de los intervalos formados por los valores mínimos y máximos, respectivamente, entre los que la señal analítica es directamente proporcional a la concentración del analito.

Las técnicas basadas en plasmas acoplados inductivamente tienen la desventaja de que para su operación se requiere de personal altamente calificado y utilizan flujos elevados de argón, el cual es un gas muy costoso.

Por otra parte, cuando se compara MP-AES con las técnicas de absorción atómica, es donde se aprecia la mayor cantidad de beneficios, los cuales incluyen:

- Límites de detección más bajos. (Excepto para GFAAS).
- Un rango dinámico lineal más amplio, lo cual significa que se pueden determinar concentraciones más elevadas.
- Incremento en el rendimiento de la muestra, ya que es posible analizar más elementos en una muestra.

- Mayor productividad, ya que puede dejarse funcionando toda la noche sin requerir atención.
- No se requiere de comprar o reemplazar múltiples lámparas de cátodo hueco.
- La habilidad de agregar otros analitos al conjunto de elementos según lo demande el análisis.
- Se elimina el riesgo de utilizar acetileno u óxido nitroso.

A lo anterior hay que agregar que una de las ventajas más grandes de esta técnica sobre las demás es que funciona con aire comprimido, lo que significa que no se requiere de argón gaseoso o líquido (únicamente una cantidad pequeña para encender el plasma) lo que lo hace muy atractivo para los laboratorios donde el presupuesto es muy ajustado. (Thomas, 2014).

Se han reportado múltiples aplicaciones que utilizan MP-AES. La mayoría de ellas consiste en análisis multielementales en matrices de diversa naturaleza, principalmente muestras orgánicas y complejas (tabla 3). Sin embargo, actualmente no existen reportes donde se aplique MP-AES para la determinación de propóleo y/o tinturas de propóleo.

Tabla 3. Aplicaciones de MP-AES para el análisis elemental en diferentes matrices.

Matriz	Elementos	Referencia
Gasolina y etanol	Cr, Ni, Pb, V	(Donati, Amais, Schiavo, y Nobrega, 2013)
Girasol	Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sr, V, Zn	(Karlsson, Sjöberg, y Ogar, 2015)
Metanol	Ca, K, Mg, Na	(Kulikov, 2015)
Alimento para animales y fertilizante	Cu, Fe, Mn, Zn	(Li, Simmons, Shraderb, Herrmana, y Dai, 2013)
Aceite crudo	Ca, Fe, K, Na, Ni, V	(Nelson et al., 2015a)
Vino	Ca, K, Mg, Na, Rb, Sr	(Nelson et al., 2015b)
Hojas de té	Ba, Ca, Cu, K, Mg, Ni, Sr, Zn	
Leche en polvo	Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, P, Zn	
Tejido de ostra	Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na, P, Zn	(Nham y Taylor, 2015)
Harina de arroz	Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, P, Sr, Zn	
Queso	Ca, K, Mg	(Ozbek y Akman, 2016)

Tabla 3 (cont.). Aplicaciones de MP-AES para el análisis elemental en diferentes matrices.

Matriz	Elementos	Referencia
Fibras textiles	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Tl, Zn	(Sungur y Gülmez, 2015)
Leche	Ca, K, Mg, Na, P	(Tanabe, Silva, Gilleland, y Nelson, 2015)
Vino	As	(Tanabe et al., 2016)
Jugo de frutas	Ca, K, Mg, Na	(Truong y Cauduro, 2014)
Tejidos de plantas	B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn	(Vummiti, 2015)
Alcohol isopropílico	Ca, K, Mg, Na	(Young-Jin, 2015)
Cuero y pelaje	Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb	(Zhao et al., 2015)

Una de las ventajas más interesantes de MP-AES es su relativa estabilidad a la introducción de solventes orgánicos, lo que permite que muestras como las tinturas de propóleo se introduzcan directamente en el equipo sin necesidad de digestión previa. Sin embargo, varios estudios (Boorn y Browner, 1982; Hu, Hub, Gao, Liu, y Lin, 2004; Saint’Pierre, Tormen, Frescura, y Curtius, 2006) han reportado un posible efecto de disminución o aumento de la señal proporcional a la concentración de etanol (u otros solventes orgánicos), lo que provocaría curvas de calibración con el mismo intervalo de concentración, pero con diferente pendiente. Debido lo anterior y a que la mayoría de las tinturas comerciales no reportan el contenido de etanol, es necesario comparar estadísticamente las diferentes curvas y determinar la concentración de etanol para así tener la certeza de que el análisis se hace con la curva de calibración adecuada.

Validación de métodos analíticos

La aplicación de métodos analíticos validados garantiza la obtención de resultados confiables.

Actualmente, existen diferentes guías que sirven de orientación para validar una metodología analítica. En este trabajo se siguió la guía emitida por la Unión Europea llamada Directiva 96/23/CE del Consejo Europeo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (2002). Este documento define la validación como la confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto. Dichos requisitos también se conocen como características de funcionamiento y son, en conjunto, la calidad funcional que puede atribuirse a un método analítico. Así, las características de funcionamiento relevantes para este trabajo son:

- Exactitud: grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Se obtiene determinando la recuperación o veracidad y la precisión.
- Precisión: grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas.
- Recuperación: porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico. Este factor se determina durante la validación si no se dispone de material de referencia certificado.
- Repetibilidad: Precisión en condiciones en las que un mismo operador obtiene resultados independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.
- Robustez: susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales.
- Selectividad: capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.
- Veracidad: Grado de concordancia existente entre el valor obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

De igual manera, se consideraron las definiciones de la Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados (Eurachem working group, 1998) para las siguientes características de funcionamiento:

- Confirmación de identidad: La señal producida atribuida al analito se debe a éste y no a la presencia de algo física o químicamente similar o al azar.
- Límite de detección: Concentración más baja de analito en una muestra que puede ser detectada confiablemente por el método.
- Límite de cuantificación: Concentración más baja de un analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de exactitud y precisión.
- Linealidad: Habilidad (en un rango dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra.
- Sensibilidad: Gradiente de la curva de respuesta. Cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito.

HIPÓTESIS

La aplicación de un método basado en el uso de la técnica analítica Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma de Microondas (MP-AES) permitirá la detección y cuantificación de elementos químicos en propóleo crudo, sus extractos etanólicos (tinturas) y en el residuo sólido de extracción.

JUSTIFICACIÓN

El propóleo es un producto de la colmena que se utiliza, gracias a sus diversas propiedades, en el sector medicinal, alimentario e industrial. De igual forma, las tinturas de propóleo son especialmente conocidas por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas y se han posicionado como una alternativa segura para el tratamiento de diversas dolencias.

Debido a lo anterior, el propóleo representa una excelente área de oportunidad económica y de diversificación para los apicultores mexicanos. Muestra de ello es que la producción de propóleo en el país ha ido en ascenso, situándose en 2008 en las 6.8 toneladas a nivel nacional.

Por lo tanto, contar con un método confiable para determinar la composición elemental del propóleo y sus tinturas es importante en dos aspectos. Por una parte, permite conocer el contenido de elementos esenciales, lo cual impacta directamente en el conocimiento de su calidad nutricional. Por otro lado, la presencia de metales pesados y otros elementos contaminantes pueden poner en riesgo la salud del consumidor por lo que es crucial conocer su inocuidad.

Para la determinación del contenido de metales en el propóleo y sus tinturas se han desarrollado métodos basados principalmente en AAS, ICP-AES, ICP-OES, ICP-MS, NAA, entre otras. Estas técnicas son, en su mayoría, caras, peligrosas o restringidas al uso de equipos altamente especializados.

Actualmente, no se han reportado estudios que apliquen la técnica de MP-AES para la cuantificación de metales en propóleo crudo y sus tinturas. MP-AES, además de ser innovadora, es una alternativa viable para su aplicación en análisis de rutina pues es una técnica sencilla, segura, asequible y rápida.

Finalmente, en la literatura científica se han encontrado investigaciones con muestras de propóleo provenientes de diversas partes del mundo como Argentina, Brasil, Chile, Croacia y España; sin embargo, los estudios con muestras de propóleo o tinturas mexicanos son escasos y se enfocan únicamente a la determinación de metales contaminantes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar la espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES) para la determinación de metales en propóleo, sus extractos etanólicos (tinturas) y el residuo sólido de extracción.

Objetivos particulares

- Definir las condiciones instrumentales para la identificación y cuantificación de metales en propóleo, sus extractos etanólicos y el residuo sólido de extracción por MP-AES.
- Validar el método de análisis de metales por MP-AES en propóleo, sus extractos etanólicos y el residuo sólido de extracción.
- Determinar la cantidad de metales en muestras de propóleo crudo, extractos etanólicos control y comerciales y los residuos sólidos de extracción.
- Validar el método para la determinación de etanol en extractos etanólicos de propóleo.
- Determinar la cantidad de etanol en extractos etanólicos comerciales de propóleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología general del proyecto

El propóleo crudo (fortificado y sin fortificar) y los residuos sólidos resultantes de la extracción se digirieron por calcinación y se analizaron, junto con tinturas control (fortificadas y sin fortificar), por espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES). Para la cuantificación de los analitos se utilizó el método de calibración externa.

Todo el material de laboratorio utilizado se lavó previamente con HNO₃ al 10% durante 24 horas para eliminar cualquier sustancia interferente.

También, se determinó la cantidad de etanol en tinturas control con el método de oxidación con dicromato de potasio.

Los métodos se validaron mediante la evaluación de las siguientes características de funcionamiento: confirmación de la identidad, selectividad, sensibilidad, exactitud, precisión (repetibilidad), límite de detección, límite de cuantificación, rango lineal y de trabajo, estabilidad y robustez. Después de la validación, se aplicaron los métodos a muestras reales.

La figura 1 muestra el diagrama general de la metodología descrita anteriormente.

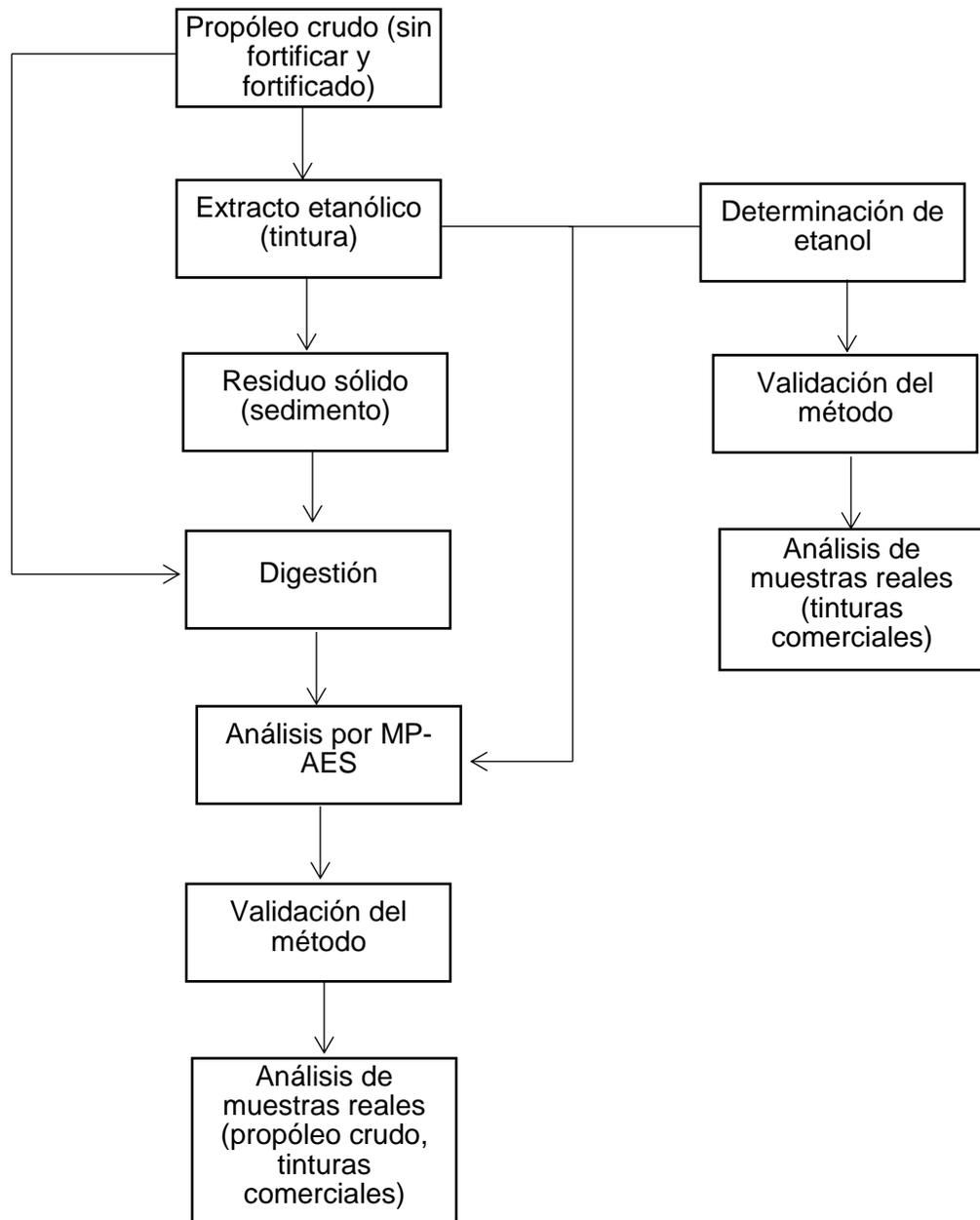


Figura 1. Diagrama general de la metodología.

Muestras

Propóleo crudo

Se emplearon cuatro muestras de propóleo crudo para la determinación de los metales y la preparación de tinturas control. La información de cada una de ellas se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Muestras de propóleo crudo.

ID	Procedencia (Institución)
M1	Mocochá, Yucatán (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP)
M2	Mérida, Yucatán (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán).
M3	Querétaro, Querétaro
M4	Tizimín, Yucatán

Tinturas de propóleo comerciales

Se analizaron 23 tinturas de propóleo comerciales: 22 se adquirieron en la ciudad de Mérida, Yucatán; y una se adquirió en Ciudad del Carmen, Campeche. En la tabla 5 se resume la información de cada una de las tinturas comerciales.

Tabla 5. Muestras de tinturas de propóleo comerciales.

No.	Fabricante / marca	Denominación	Alcohol (%)	Contenido neto (mL)	Observaciones
1	Apiarios Rancaño	Extracto de propóleo.	NR	30	
2	La tía Trini	Extracto de propóleo.	NR	30	Con menta. Base hidroalcohólica.
3	X'cabachen	Tintura de propolio.	NR	30	
4	Tropical honey. Proposana	Extracto de propóleo.	NR	30	
5	"Casero"	Propóleo con alcohol.	NR	50*	
6	Mimiel	Extracto de propóleo.	80	35	
7	Janlikab	Extracto de propóleo.	NR	40	
8	Naturway	Propóleo concentrado	NR	40	
9	Abel ha	Extracto de propóleo	80	35	
10	Nutrisa	Extracto de propóleo	NR	45	

Tabla 5 (cont.). Muestras de tinturas de propóleo comerciales.

No.	Fabricante / marca	Denominación	Alcohol (%)	Contenido neto (mL)	Observaciones
11	Honeybee. Nutrisa	Extracto fluido de propóleo	NR	20	
12	La tía Trini	Extracto de propóleo	NR	20	Base hidroalcohólica
13	Yuca-Miel	Propóleo concentrado	NR	20	
14	Uxmal	Extracto de propóleo	80	40*	
15	Natura-Mundo Brajim	Tintura de propóleo reforzado	NR	60	<i>Con Calendula officinalis, Thymus vulgaris, Myroxylon balsamum, Cymbopogon nardus</i>
16	Grupo Rancaño	Rociador de propóleo bucofaríngeo	NR	45	Con mentol
17	Brilhar	Tintura de propóleo	NR	40	Con extracto de gordolobo, extracto de eucalipto, ácido ascórbico
18	Armonía vital	Extracto de propóleo	NR	40	Con miel de abeja
19	Bio Meliponum	Extracto de propolis	0	30	Con miel de meliponinos
20	Lol Cab	Extracto de propóleo acuoso	0	35	20% de propóleo
21	Lol Cab	Extracto de propóleo	NR	35	20% de propóleo
22	Laboratory Nutrition Lab and Flavors	Propóleo 100% natural.	NR	25	
23	Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales, S.A. de C.V. Broncolín	Propóleo. Extracto fluido.	NR	30	Cada 100 mL: 7.0 g de propóleo refinado.

NR: No reportado.

*Contenido aproximado.

Cuantificación de metales por MP-AES

Para la cuantificación de los elementos y la evaluación de las características de funcionamiento se siguió el esquema que aparece en la figura 2. La digestión, fortificación y preparación de tinturas se hizo a partir de propóleo crudo M1 (Mocochá, Yucatán). El propóleo se trituró, lo más finamente posible, en un mortero de ágata adicionando nitrógeno líquido.

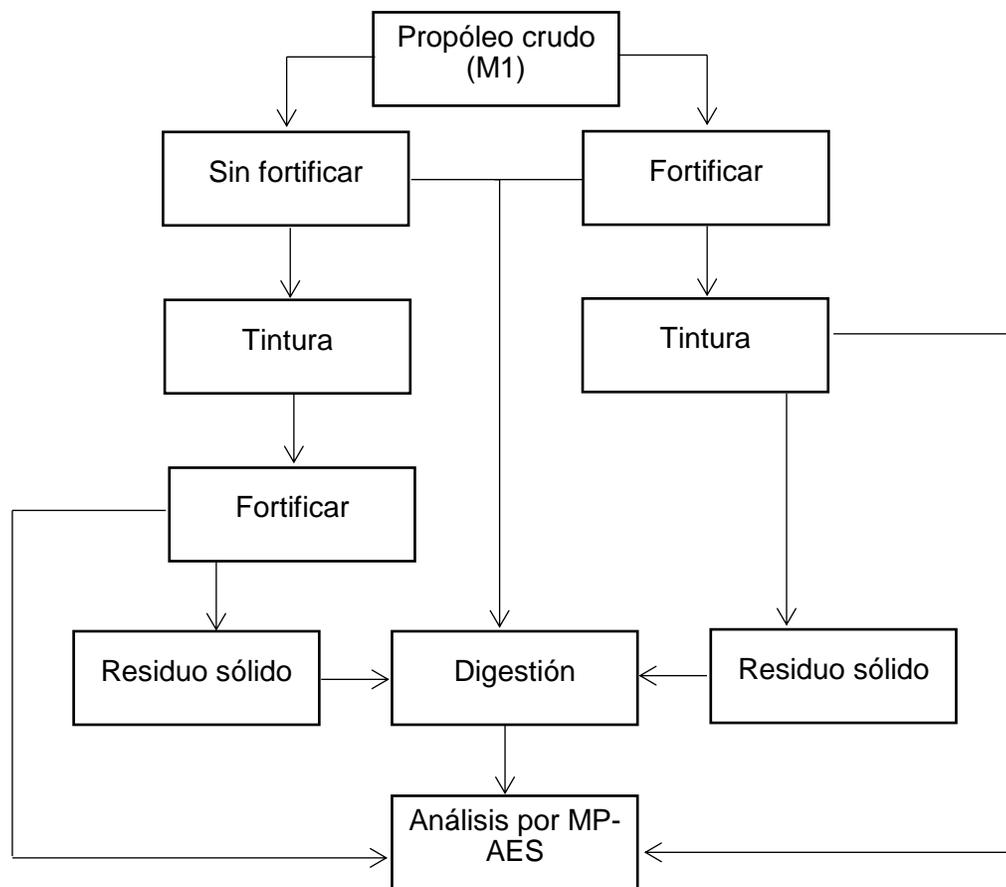


Figura 2. Diagrama de preparación de propóleo y tinturas sin fortificar y fortificados.

Propóleo crudo sin fortificar

Se pesó, por triplicado, 0.5000 g de propóleo crudo en crisoles de porcelana, después se carbonizó y calcinó.

Fortificación de propóleo crudo

La fortificación del propóleo crudo se realizó a dos niveles, los cuales corresponden a 50 y 150 veces los límites máximos permitidos (LMP) del Cd, Cr, Fe, Ni, Pb y Zn en el propóleo (tabla 6), según la Unión Europea (Di Bartolomeo, Cilurzob, Cristianob, Cifelli, y Locatelli). Se trabajó a esos niveles de fortificación para poder detectar un cambio de señal lo suficientemente elevado durante el análisis instrumental.

Se fortificaron doce porciones de 0.5000 g de propóleo crudo M1 (seis porciones por cada nivel de fortificación) mediante la adición de 1 mL de la solución estándar multielemental correspondiente. Las porciones fortificadas se dejaron reposar durante 48 horas para permitir la incorporación completa de los analitos al propóleo.

Tabla 6. Niveles de fortificación de propóleo crudo.

Elemento	LMP (mg·kg ⁻¹)	Fortificación (mg·kg ⁻¹)	
		50x	150x
Cd	0.01	0.5	1.5
Cr	0.15	7.5	22.5
Fe	4	200	600
Ni	0.01	0.5	1.5
Pb	1	50	150
Zn	3	150	450

Preparación de tinturas control

Las tinturas se prepararon con nueve porciones de 0.5000 g de propóleo crudo M1 sin fortificar y seis porciones fortificadas (tres porciones por cada nivel de fortificación). A cada porción se le agregó 1.5 mL de etanol al 80%. Se siguió la proporción 1:3 (propóleo:solvente) recomendada por la NOM-003-SAGGAN-2017. Las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar 15 días a temperatura ambiente. Durante ese lapso, se agitaron diariamente. Posteriormente, permanecieron en refrigeración a una temperatura de 0°-4°C por 3 días. Después, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 minutos, se tomó el sobrenadante y se hizo pasar a través de un filtro de jeringa de celulosa de 0.45 µm. Finalmente, se envasaron en frascos ámbar y se refrigeraron hasta el momento de su análisis. El diagrama de la preparación de las tinturas se muestra en la figura 3.

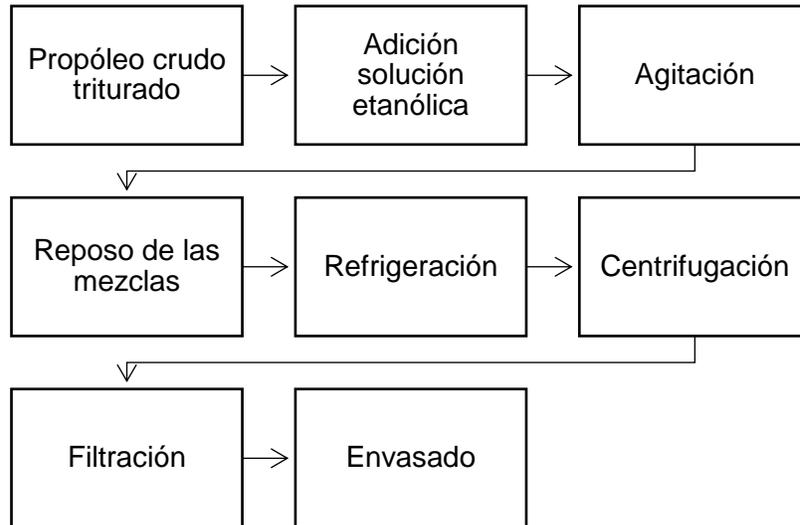


Figura 3. Diagrama de la metodología de elaboración de tinturas de propóleo.

Fortificación de tinturas control

Se fortificaron seis tinturas (tres tinturas por cada nivel de fortificación), preparadas con propóleo sin fortificar M1, mediante la adición de 1 mL de la solución estándar correspondiente a alícuotas de 0.5 mL de cada tintura. Las concentraciones finales (en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se muestran en la tabla 7. Se alcanzaron las mismas concentraciones en las tinturas preparadas a partir de propóleo fortificado.

Tabla 7. Concentraciones finales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de los elementos añadidos a tinturas control.

Elemento	Nivel de fortificación	
	50x	150x
Cd	0.17	0.5
Cr	2.5	7.5
Fe	66.67	200
Ni	0.17	0.5
Pb	16.67	50
Zn	50	150

Digestión de propóleo crudo y residuos sólidos de extracción

En una placa de calentamiento se carbonizaron gradualmente las tres porciones del propóleo crudo sin fortificar y seis porciones fortificadas (tres porciones por cada nivel de fortificación), así como los residuos sólidos generados de la extracción con etanol. Después, se calcinaron en una mufla a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas. Finalmente, las cenizas

se diluyeron con 1 mL de HNO₃ concentrado y se aforó a 10 mL con agua ultrapura (obtenida con un equipo de filtración Milli-Q-Reference, Millipore).

Análisis espectrométrico

Condiciones instrumentales

Para el análisis elemental se utilizó el MP-AES modelo 4200 de la marca Agilent. Las especificaciones del equipo se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Especificaciones del MP-AES 4200 y parámetros de operación.

Parte	Especificaciones
Imán	2.45 GHz, 400 mA CD, 1 kW
Sistema de introducción de la muestra	
Nebulizador	OneNeb
Cámara de nebulización	Ciclónica
Antorcha	Cuarzo, inyector de 1.0 mm
Velocidades del flujo de N ₂	
Nebulizador	Variable: 0.3-1.0 L·min ⁻¹
Intermedio	1.5 L·min ⁻¹
Externo	19.5 L·min ⁻¹
Visualización del plasma	Axial
Monocromador	
Tipo	Czerny-Turner
Longitud focal	600 mm
Espejo colimador	Esférico, 75 mm de diámetro
Espejo de enfoque	Esférico, 87 mm de diámetro
Rejilla	Holográfica 90 x 90 mm, 2400 líneas·mm ⁻¹
Apertura de entrada	2.5 mm alto x 19 µm ancho
Detector	CCD, 532 ancho x 128 alto, tamaño de píxel: 24 x 24 µm, enfriamiento Peltier a 0°C

- Longitud de onda. Para cada analito, se seleccionaron las longitudes de onda más sensibles y con menor cantidad de interferencias, establecidas por defecto por el programa del instrumento.

- Posición de visualización y flujo del nebulizador. La optimización de estos dos parámetros se realizó automáticamente con ayuda del programa del equipo (MP Expert versión 1.5.1.6821) y empleando el estándar de calibración intermedio de cada curva. Este procedimiento se realizó cada vez que se empleó una nueva curva de calibración.

- Inyección de aire. Se activó esta opción cuando se analizaron las tinturas control y comerciales, debido a la presencia de etanol en éstas. Se utilizó un nivel de flujo medio para el análisis de todos los elementos.

En las tablas 9 y 10 se presentan las longitudes de onda, los valores de la posición de visualización y del flujo del nebulizador que se emplearon en los análisis de propóleo crudo y residuos sólidos de extracción, y tinturas control, respectivamente.

Tabla 9. Condiciones instrumentales finales para el análisis de propóleo crudo y residuos sólidos de extracción.

Elemento (λ)	Posición de visualización	Flujo nebulizador (L·min ⁻¹)*	Elemento (λ)	Posición de visualización	Flujo nebulizador (L·min ⁻¹)*
Al (396.152)	10	0.75	Ca (393.366)	10	0.5
As (193.695)	-20	0.5	Ca (396.847)	10	0.5
Ba (455.403)	10	0.7	Ca (646.847)	10	0.35
Cd (228.802)	0	0.5	Fe (371.993)	-10	0.75
Co (340.512)	-10	0.75	K (766.491)	0	1
Cr (425.433)	10	0.95	K (769.897)	10	0.9
Cu (324.754)	-10	0.7	Mg (285.213)	10	0.9
Mn (403.076)	10	1	Na (588.995)	0	0.9
Ni (352.454)	-10	0.7			
Pb (405.781)	-120	0.45			
Se (196.026)	-10	0.5			
Sr (407.771)	10	0.95			
Zn (213.857)	-10	0.6			

Optimización con estándar multielemental de 0.50 mg·L⁻¹ (minoritarios) y 5.00 mg·L⁻¹ (mayoritarios).

λ: longitud de onda de emisión, nm.

*: nebulización con N₂.

Tabla 10. Condiciones instrumentales finales para el análisis de tinturas control.

Elemento (λ)	Posición de visualización	Flujo nebulizador (L·min ⁻¹)*	Elemento (λ)	Posición de visualización	Flujo nebulizador (L·min ⁻¹)*
Al (396.152)	10	0.75	Ca (393.366)	0	0.5
As (193.695)	-20	0.5	Ca (396.847)	0	0.45
Ba (455.403)	10	0.7	Ca (646.847)	-10	0.4
Cd (228.802)	0	0.5	Fe (371.993)	0	0.7
Co (340.512)	-10	0.75	K (766.491)	0	1
Cr (425.433)	10	0.95	K (769.897)	0	0.95
Cu (324.754)	-10	0.7	Mg (285.213)	0	0.55
Mn (403.076)	10	1	Na (588.995)	-10	1
Ni (352.454)	-10	0.7			
Pb (405.781)	-120	0.45			
Se (196.026)	-10	0.5			
Sr (407.771)	10	0.95			
Zn (213.857)	-10	0.6			

Optimización con estándar multielemental de 0.50 mg·L⁻¹ (minoritarios) y 5.00 mg·L⁻¹ (mayoritarios).

λ : longitud de onda de emisión, nm.

*: nebulización con N₂.

Construcción de curvas de calibración externas

Los elementos analizados se clasificaron en minoritarios y mayoritarios:

- Elementos minoritarios: Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn.
- Elementos mayoritarios: Ca, Fe, K, Mg, Na.

Dicha clasificación se debió principalmente a las concentraciones de los elementos que se han reportado en el propóleo en estudios anteriores (Andrade et al., 2013; Bonvehí y Bermejo, 2013; Cvek et al., 2007; Gong et al., 2012). Por lo tanto, los intervalos de las curvas de calibración variaron en función del tipo de elemento. La curva de los elementos minoritarios se construyó con los puntos 0.00, 0.01, 0.05, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 3.00 mg·L⁻¹; y la curva de los elementos mayoritarios con los puntos 0.00, 0.25, 0.50, 1.50, 5.00, 10.00, 20.00 y 30.00 mg·L⁻¹.

Las curvas se construyeron a partir de soluciones estándar comerciales de 1000 mg·L⁻¹. Se usaron curvas acuosas en los análisis de propóleo crudo y residuos sólidos de extracción y, curvas etanólicas al 80%. en los análisis de tinturas control y comerciales.

Efecto del contenido de etanol en la sensibilidad

Para estudiar el efecto del etanol en la intensidad de emisión se compararon los interceptos y las pendientes de las curvas de calibración a seis diferentes concentraciones de etanol: 0%, 10%, 70%, 80%, 90% y 100% v/v, cada una por triplicado. Los elementos se dividieron en minoritarios y mayoritarios y se emplearon los mismos intervalos que en el apartado anterior, 0.00-3.00 mg·L⁻¹ y 0.00-30.00 mg·L⁻¹, respectivamente. Con excepción del Mg y Na, cuyos intervalos fueron 0.00-20.00 mg·L⁻¹ y 0.00-10.00 mg·L⁻¹, respectivamente. Las curvas se elaboraron por triplicado, por cada concentración de etanol. En total, se midió la intensidad de la emisión de 18 curvas para cada elemento. Se calculó el promedio de las tres mediciones por cada concentración de etanol. Finalmente, se compararon las pendientes y los interceptos de cada curva por cada uno de los elementos. Las pruebas estadísticas que se llevaron a cabo se describen en el Anexo Comparación de curvas de calibración. Para los cálculos se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVII v. 17.0.16 (Statpoint, 2014).

Validación del método

En la tabla 11 aparecen las características de funcionamiento que se evaluaron, y los criterios de aceptación correspondientes.

Tabla 11. Características de funcionamiento del método, parámetros y criterios de aceptación.

Característica de funcionamiento	Parámetro	Criterio de aceptación
Confirmación de identidad	Presencia / ausencia señal del analito	Presencia de señal del analito en solución estándar y muestra fortificada.
Selectividad	Efecto de interferencias en la identificación y cuantificación del analito.	Longitud de onda con interferencias mínimas en la identificación y cuantificación del analito.
Sensibilidad	Valor de pendientes de curvas de calibración.	Longitud de onda para cada analito que produce el mayor valor de pendiente.
Exactitud	Porcentaje de recuperación.	90-110%
Precisión (repetibilidad)	Desviación estándar relativa (RSD), según la concentración de analito en la muestra.	$\leq 20\%$ (conc. ≥ 10 -100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) $\leq 15\%$ (conc. > 100 -1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) $\leq 10\%$ (conc. ≥ 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Límite de detección (LoD)	$\frac{3\sigma}{m}$	
Límite de cuantificación (LoQ)	$\frac{10\sigma}{m}$	
Rango de trabajo / rango lineal	Valor de r^2 y curva de residuales de la gráfica de la señal del analito contra su concentración.	Intervalo donde la señal del analito es directamente proporcional a su concentración. $r^2 > 0.999$ Curva de residuales sin tendencias.

Los experimentos que se llevaron a cabo para evaluar las características de funcionamiento fueron los siguientes:

- Confirmación de identidad. Se compararon las señales de muestras fortificadas y soluciones estándar de los analitos.
- Selectividad. Se utilizó la longitud de onda con menor cantidad de interferentes (ver Condiciones instrumentales), además, se verificó la presencia de posibles interferencias en la región de la señal de emisión de cada analito en muestras sin fortificar de propóleo crudo, tinturas y residuos sólidos de extracción.

- Sensibilidad. Se eligió la longitud de onda de emisión más sensible para cada analito (ver Condiciones instrumentales).

- Exactitud. Se calculó el promedio del porcentaje de recuperación de las muestras fortificadas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = 100 \times \frac{\text{Concentración MF} - \text{concentración MSF}}{\text{Nivel de fortificación}}$$

donde:

MF = muestra fortificada

MSF = muestra sin fortificar

- Precisión (repetibilidad). Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) sobre el promedio del porcentaje de recuperación de cada analito de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud.

- Límite de detección (LoD) (instrumental). Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{LoD} = \frac{3\sigma}{m}$$

donde:

σ = desviación estándar del ruido para la concentración más baja de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración.

- Límite de cuantificación (LoQ) (instrumental). Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{LoQ} = \frac{10\sigma}{m}$$

donde:

σ = desviación estándar del ruido para la concentración más baja de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración.

- Rango lineal y de trabajo. El rango de trabajo se determinó a partir de la inspección visual de las curvas de calibración acuosas. Posteriormente, dentro del rango de trabajo ya establecido, se realizó un análisis de regresión lineal para cada una de las

curvas de calibración y se calcularon los parámetros correspondientes. De igual manera se elaboraron y se analizaron las gráficas residuales de cada curva.

Análisis de muestras reales

Se determinó la cantidad de metales en tres muestras de propóleo crudo (M2, M3, M4) y 23 tinturas comerciales, cuyas características se mencionan en las tablas 4 y 5, respectivamente.

Cuantificación de etanol por reducción de Cr⁶⁺ (método indirecto)

Para la cuantificación de etanol se empleó el método, sin modificaciones, propuesto por Magrí, Magrí, Balestrieri, Sacchini, y Marini (1997): en ácido perclórico, el cromo (VI) reacciona cuantitativamente con etanol para formar cromo (III) y ácido acético. La reacción se completa en 15 minutos, aproximadamente, a temperatura ambiente y el cromo (VI) que se consumió se determinó por el decremento de la absorbancia a 267 nm. Una característica importante de este método es que las muestras deben estar diluidas de tal forma que su concentración de etanol sea de 0.1% v/v.

Preparación de tinturas control

Las tinturas se prepararon con tres porciones de 3.000 g de propóleo crudo M1. A cada una de las porciones se les agregó 9 mL de solución etanólica al 40%, 80% y 100%, respectivamente. Se siguió la proporción 1:3 (propóleo:solvente) recomendada por la NOM-003-SAGGAN-2017. Se realizó el mismo procedimiento indicado en la figura 3.

Pretratamiento de tinturas comerciales

Se tomaron 2 mL de cada una de las 23 muestras de tinturas de propóleo comerciales, se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 minutos, se tomó el sobrenadante y se hizo pasar a través de un filtro de jeringa de celulosa de 0.45 µm.

Preparación de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇), 3.3 mmol L⁻¹

Se pesaron 0.0981 g de K₂Cr₂O₇, secado previamente a 110°C, y se aforó a 10 mL con agua ultrapura.

Preparación de ácido perclórico (HClO₄), 7 mol L⁻¹

Se tomaron 3 mL de HClO₄ (60% m/v) y se aforó a 10 mL con agua ultrapura.

Preparación de blanco acuoso

En un matraz volumétrico de 10 mL se agregó 1 mL de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 3.3 mmol L^{-1} y 3 mL de $HClO_4$ (60% m/v), posteriormente se aforó a 10 mL con agua ultrapura.

Preparación de blancos al vacío y liofilizados

Debido la cantidad de sustancias reductoras que pueden encontrarse en las tinturas y para minimizar su impacto; se prepararon, por triplicado, blancos de muestra de cada una de ellas evaporando el etanol mediante dos procedimientos diferentes: al vacío y liofilización. En ambos casos, las tinturas se congelaron con nitrógeno líquido, se evaporaron a sequedad y se reconstituyeron con 2 mL de agua ultrapura. El proceso de evaporación al vacío (1.6 mm de Hg) se llevó a cabo por 24 horas; mientras que la liofilización por 3 días (-40°C , 0.4 mbar).

Cuantificación de etanol en tinturas y blancos por espectrofotometría UV-vis

En un matraz volumétrico de 10 mL se agregó 1 mL de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 3.3 mmol L^{-1} y 3 mL de $HClO_4$ (60% m/v), posteriormente se adicionó 100 μL de la tintura (diluida de tal forma que tuviera 0.1% v/v de etanol) o blanco correspondiente y se dejó reposar por 20 minutos. Después de este tiempo, las soluciones se aforaron a 10 mL con agua ultrapura y se leyeron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Evolution 220, Thermo Scientific), registrando las absorbancias a 267 nm (A_1 : absorbancia de la muestra, A_0 : absorbancia del blanco). Para la línea base se empleó la solución de $HClO_4$ 7 mol L^{-1} . Todos los blancos y tinturas se leyeron por triplicado.

Para el cálculo de la cantidad de etanol en las muestras se utilizaron las siguientes fórmulas (Magrí et al., 1997):

$$\text{Contenido volumétrico de alcohol (\%)} = \frac{3(M_0 - M_1)11.51D}{0.78934V}$$

donde:

D = factor de dilución de la muestra.

V = volumen (mL) de la muestra diluida tomada para el análisis.

11.51 = peso equivalente del etanol en la reacción de oxidación a ácido acético.

0.78934 = densidad del etanol a 20°C .

$(M_0 - M_1)$ = cantidad (mol L^{-1}) de cromo (VI) reducida a cromo (III) en la reacción de oxidación de etanol a ácido acético.

$$M_i = \frac{b_i + \sqrt{b_i^2 - 4ac_i}}{2a}$$

donde:

$$a = \varepsilon_2^2$$

$$b_i = 4\varepsilon_2 A_i - \frac{\varepsilon_1(\varepsilon_2 - 2\varepsilon_1)}{k'_{2,2}}$$

$$c_i = A_i \left(4A_i - \frac{\varepsilon_2 - 2\varepsilon_1}{k'_{2,2}} \right)$$

A = absorbancia a 267 nm.

i = 0 o 1

$\varepsilon_1 = 1690 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, absorptividad molar aparente ($\lambda = 267 \text{ nm}$) del cromo VI en forma de monómero.

$\varepsilon_2 = 4790 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, absorptividad molar aparente ($\lambda = 267 \text{ nm}$) del cromo VI en forma de dímero.

$k'_{2,2} = 277 \text{ L mol}^{-1}$, cociente para la reacción de dimerización.

Análisis estadístico: preparación de blancos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar el efecto del modo de preparación de los blancos (acuoso, liofilizado, y al vacío) sobre la absorbancia a 267 nm. Este análisis se realizó con el objetivo de determinar si el modo de preparación del blanco influía sobre el contenido de etanol calculado.

El ANOVA se consideró significativo cuando $P < 0.05$. Para los cálculos se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVII v. 17.0.16 (Statpoint, 2014).

Validación del método

En la tabla 12 aparecen las características de funcionamiento que se evaluaron, así como los criterios de aceptación correspondientes.

Tabla 12. Características de funcionamiento del método, parámetros y criterios de aceptación.

Característica de funcionamiento	Parámetro	Criterio de aceptación
Confirmación de identidad	Señal de absorbancia del Cr ⁶⁺ a 267 nm.	Disminución de la señal en material de referencia del analito y tinturas control.
Selectividad	Señal de absorbancia del Cr ⁶⁺ a 267 nm.	Disminución nula o mínima de la señal en soluciones estándar de potenciales interferentes.
Exactitud	Porcentaje de recuperación / veracidad	90-110%
Precisión (repetibilidad)	RSD	≤ 10%
Robustez	Porcentaje de recuperación / veracidad	90-110%
Estabilidad	Porcentaje de recuperación / veracidad	90-110%

Los experimentos que se llevaron a cabo para evaluar las características de funcionamiento fueron los siguientes:

- Confirmación de identidad. Se comparó el cambio de la absorbancia a 267 nm en soluciones estándar de etanol y en las tinturas control con respecto al blanco acuoso.
- Selectividad. Se comparó el cambio de la absorbancia a 267 nm en soluciones estándar de etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol y 1-pentanol con respecto al blanco acuoso.
- Exactitud. Se calculó el porcentaje de recuperación/veracidad en soluciones estándar de etanol y en las tinturas control, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de recuperación/veracidad} = 100 \times \frac{\text{Contenido etanol determinado}}{\text{Contenido etanol teórico/declarado}}$$

Adicionalmente, para comprobar que la exactitud del método es mejor a concentraciones de etanol cercanas o iguales a 0.1% v/v, se realizó el análisis de soluciones estándar de etanol a 40%, 70%, 80%, 90% y 100% v/v diluidas 400, 600, 800

y 1000 veces, para obtener diferentes concentraciones finales, según se indica en la tabla 13.

Tabla 13. Soluciones estándar de etanol para verificar la concentración óptima para determinar la veracidad.

Concentración (% v/v)		Concentración (% v/v)	
Inicial	Final	Inicial	Final
	0.100		0.225
40	0.067	90	0.150
	0.050		0.1125
	0.040		0.090
70	0.175	100	0.250
	0.117		0.167*
	0.0875		0.125
80	0.070		0.100
	0.200		
	0.133*		
	0.100		
	0.080		

*Concentración aproximada

- Precisión (repetibilidad). Se calculó la RSD sobre los valores del contenido volumétrico de alcohol de las soluciones estándar y las tinturas control utilizadas para evaluar la exactitud.
- Robustez. Se evaluó el porcentaje de recuperación/veracidad en muestras de diferente naturaleza: soluciones acuosas de etanol y tinturas de propóleo.
- Estabilidad. Se evaluó a través del porcentaje de recuperación de etanol en soluciones estándar y tinturas control leídas a los días 0, 1, y 4. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración entre cada uno de los análisis.

Análisis de muestras reales

Se determinó el contenido volumétrico de etanol en 23 tinturas comerciales (tabla 5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque ya existe literatura sobre la determinación de elementos químicos en el propóleo crudo y sus tinturas, hasta el momento no se ha reportado el uso de MP-AES. Por lo tanto, el desarrollo y la validación de un método basado en MP-AES es importante pues, aporta una nueva alternativa para la determinación de elementos químicos. Para desarrollar el método se establecieron las condiciones instrumentales del MP-AES, y para la validación se evaluaron algunas características analíticas del método.

Por otro lado, también se evaluó el efecto del contenido de etanol en la sensibilidad de la técnica y se determinó la cantidad de etanol en las tinturas comerciales.

Cuantificación de elementos en propóleo, tinturas y residuo sólido por MP-AES

Condiciones instrumentales

El proceso de optimización en MP-AES se llevó a cabo siempre que se analiza una nueva curva de calibración y consistió en ajustar la posición de visualización y el flujo del nebulizador para obtener las intensidades de emisión más elevadas. La posición de visualización es la posición del detector con respecto a la antorcha, de tal forma que la posición cero corresponde al centro de la antorcha (vista desde arriba). El flujo del nebulizador se refiere al volumen de gas (N_2) por unidad de tiempo, que se introduce para nebulizar la muestra antes de llegar a la antorcha.

Por lo tanto, se seleccionaron los valores que generaron las mayores intensidades de emisión de cada elemento (ver capítulo de Materiales y Métodos, tablas 9 y 10).

Validación del método

Confirmación de identidad

Se compararon las señales de propóleo crudo, tinturas control y residuos sólidos de extracción con las señales de estándares de referencia de los analitos. En las siguientes figuras aparecen ejemplos representativos del propóleo crudo (figura 4), tinturas control (figura 5) y residuos sólidos de extracción (figura 6). Se aprecia un máximo de intensidad en la longitud de onda analítica, tanto para las muestras como para los estándares, por lo que se puede afirmar que las señales son producidas por el analito.

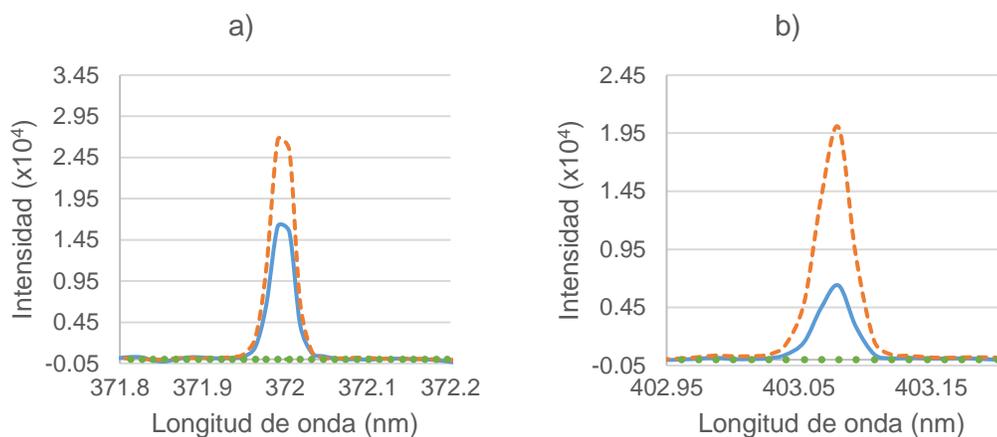


Figura 4. Espectros de emisión atómica de un blanco (---), propóleo crudo (—) y un estándar (---) de a) Fe (371.993 nm) de 3 mg·L⁻¹ y b) Mn (403.076 nm) de 0.5 mg·L⁻¹.

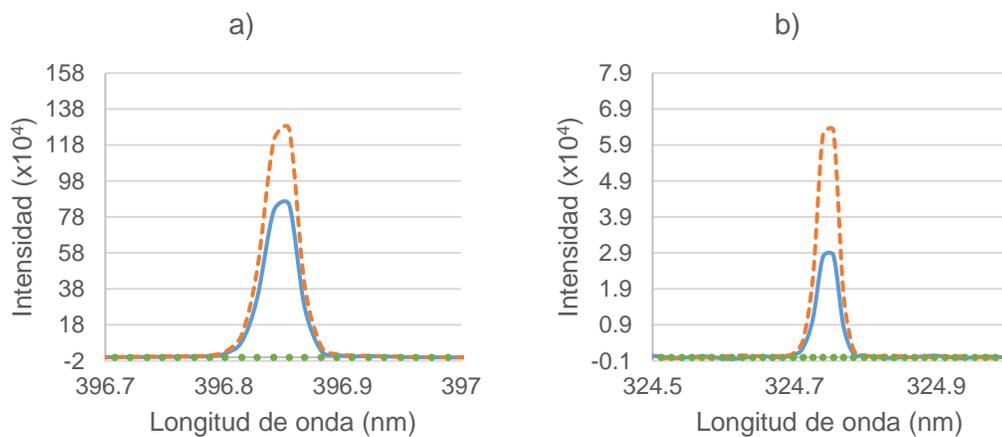


Figura 5. Espectros de emisión atómica de un blanco (---), tintura control (—) y un estándar (---) a) Ca (396.847 nm) de 1 mg·L⁻¹ y b) Cu (324.754 nm) de mg·L⁻¹.

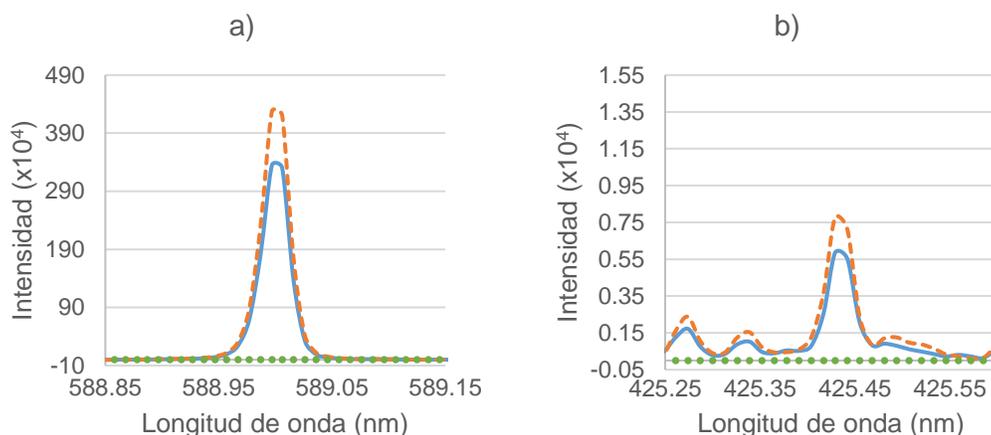


Figura 6. Espectros de emisión atómica de un blanco (---), residuo sólido de extracción (—) y un estándar (---) a) Na (588.995 nm) de 20 mg·L⁻¹ y b) Cr (425.433 nm) de 1 mg·L⁻¹.

Selectividad

Se eligieron las longitudes de onda de emisión con la menor cantidad de interferentes. En las figuras 7-10 se muestran las intensidades de las longitudes de onda seleccionadas para el Na (figura 7), Mg (figura 8), Cu (figura 9) y Zn (figura 10) junto con las intensidades de algunos elementos potencialmente interferentes. En todos los casos las intensidades de los analitos son considerablemente mayores que las intensidades de las interferencias. La intensidad de la línea del Na es 23 y 713 veces mayor que las intensidades de las líneas del Mo y el Nd, respectivamente. Para el Mg, Cu y Zn las líneas de emisión son 55-3211, 84-48720 y 29-4142 veces mayores, respectivamente, que las líneas de los interferentes. Por lo tanto, la selectividad alrededor de las regiones de emisión de cada elemento es buena.

Lo anterior se confirma con los espectros de emisión (figuras 11-14) de diferentes muestras (Mocochá, M1; Mérida, M2; Querétaro, M3; Tizimín, M4) de propóleo crudo, tinturas control y residuos sólidos de extracción, y en donde se observa la poca o nula presencia de interferentes. El mismo comportamiento se observó para los demás elementos.

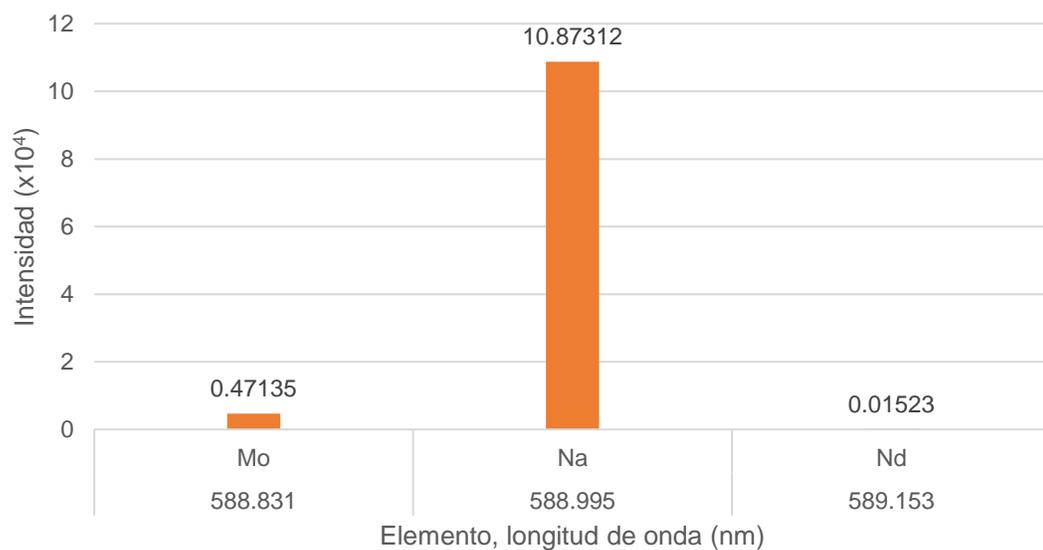


Figura 7. Posibles interferencias en Na (588.995 nm).

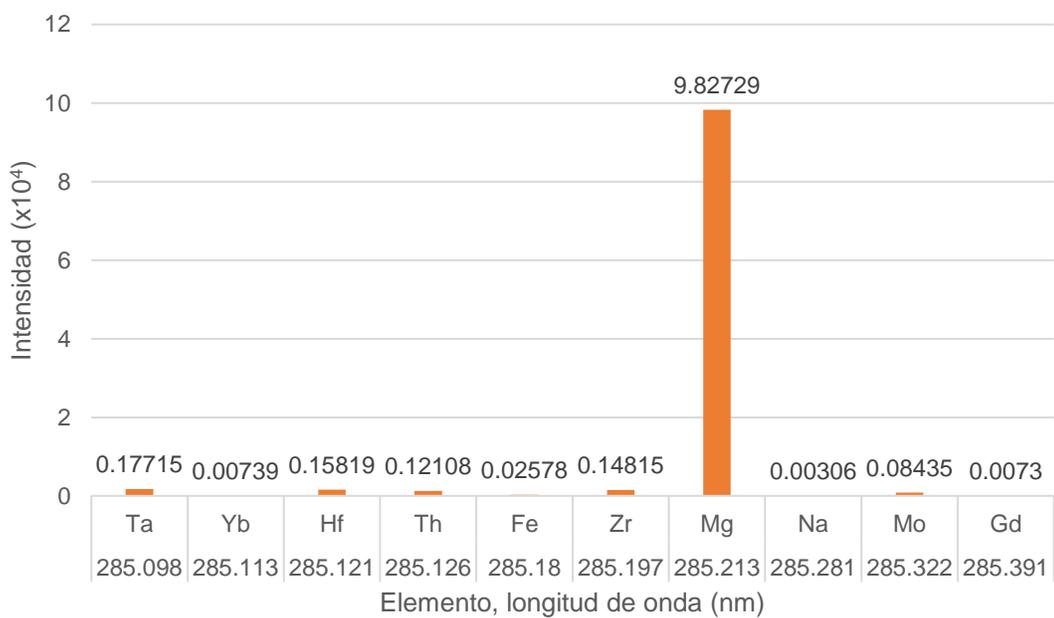


Figura 8. Posibles interferencias en Mg (285.213 nm).

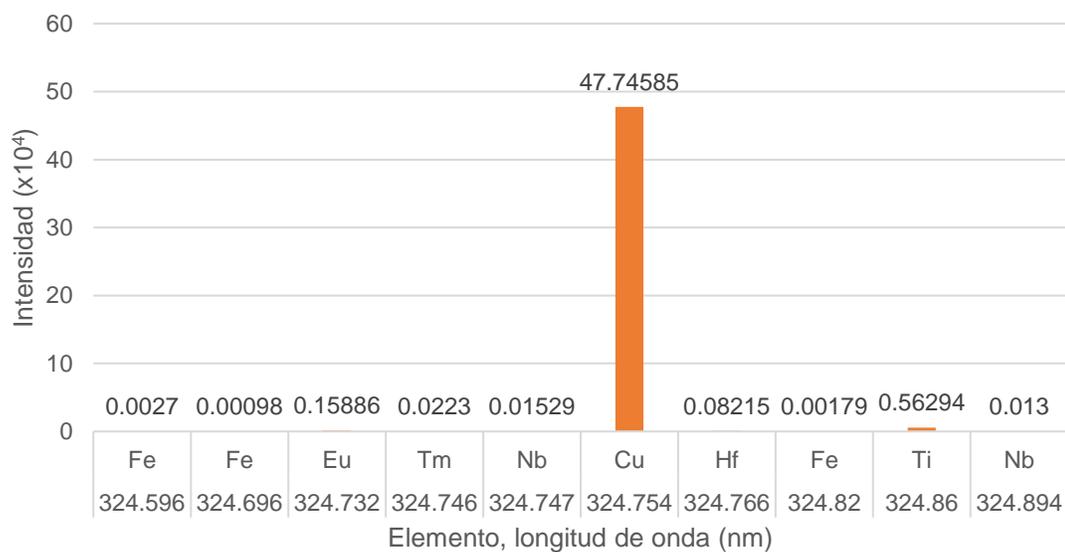


Figura 9. Posibles interferencias en Cu (324.754 nm).

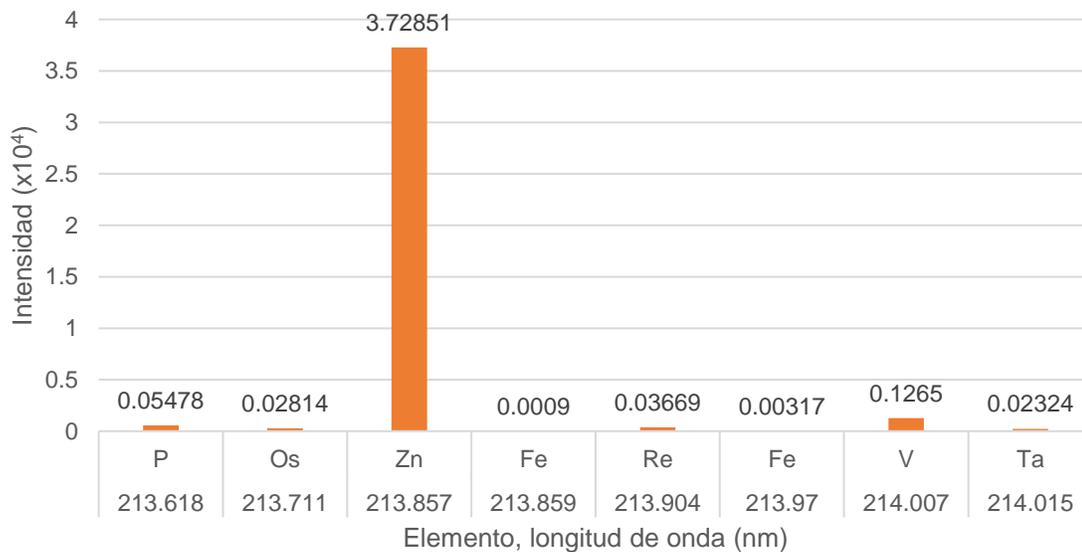


Figura 10. Posibles interferencias en Zn (213.857 nm).

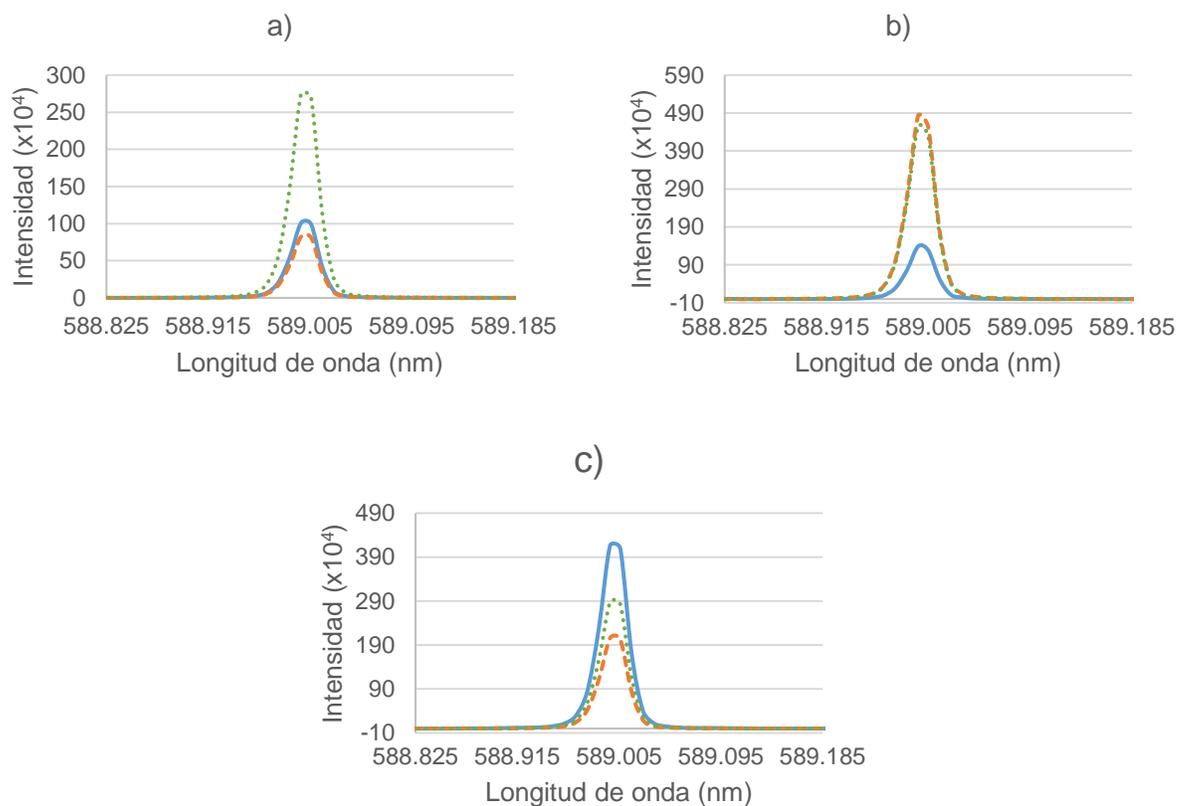


Figura 11. Espectros de emisión atómica de Na para tres diferentes muestras de a) propóleo crudo: M1 (—), M2 (---), M4 (····), b) tinturas: M3 (—), M1 (---), M2 (····) y c) residuos sólidos de extracción: M3 (—), M1 (---), M2 (····).

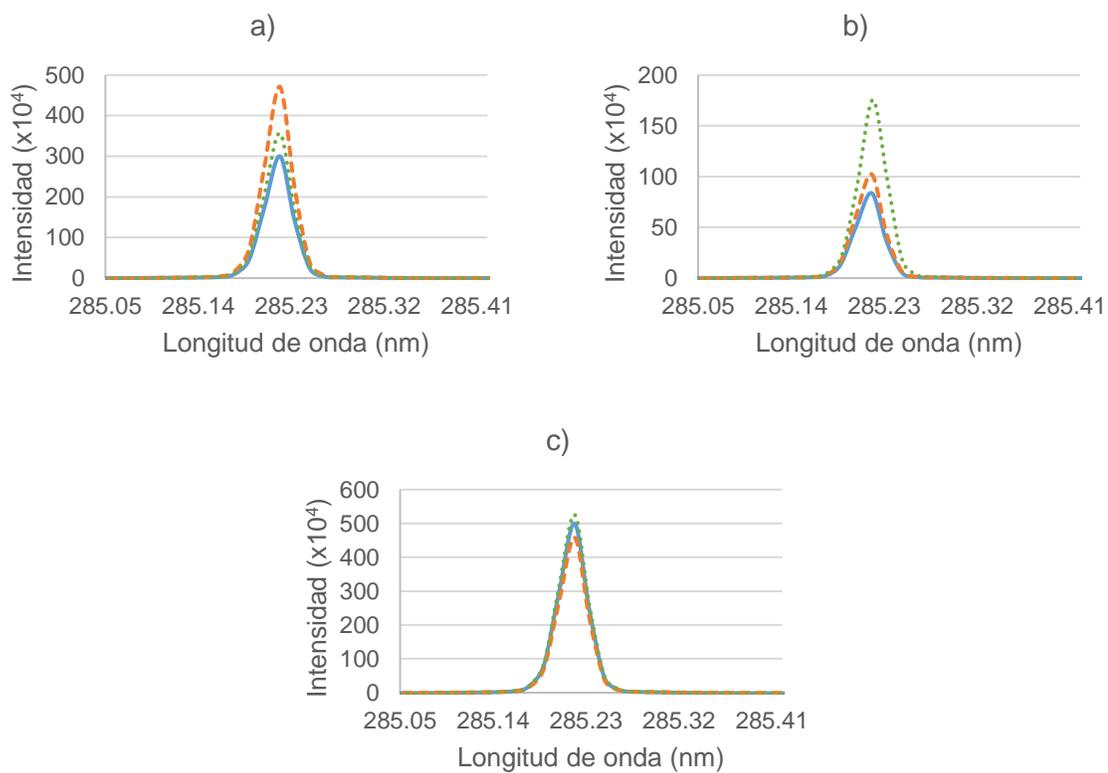


Figura 12. Espectros de emisión atómica de Mg para tres diferentes muestras de a) propóleo crudo: M1 (—), M2 (---), M4 (····), b) tinturas: M3 (—), M1 (---), M2 (····) y c) residuos sólidos de extracción: M3 (—), M1 (---), M2 (····).

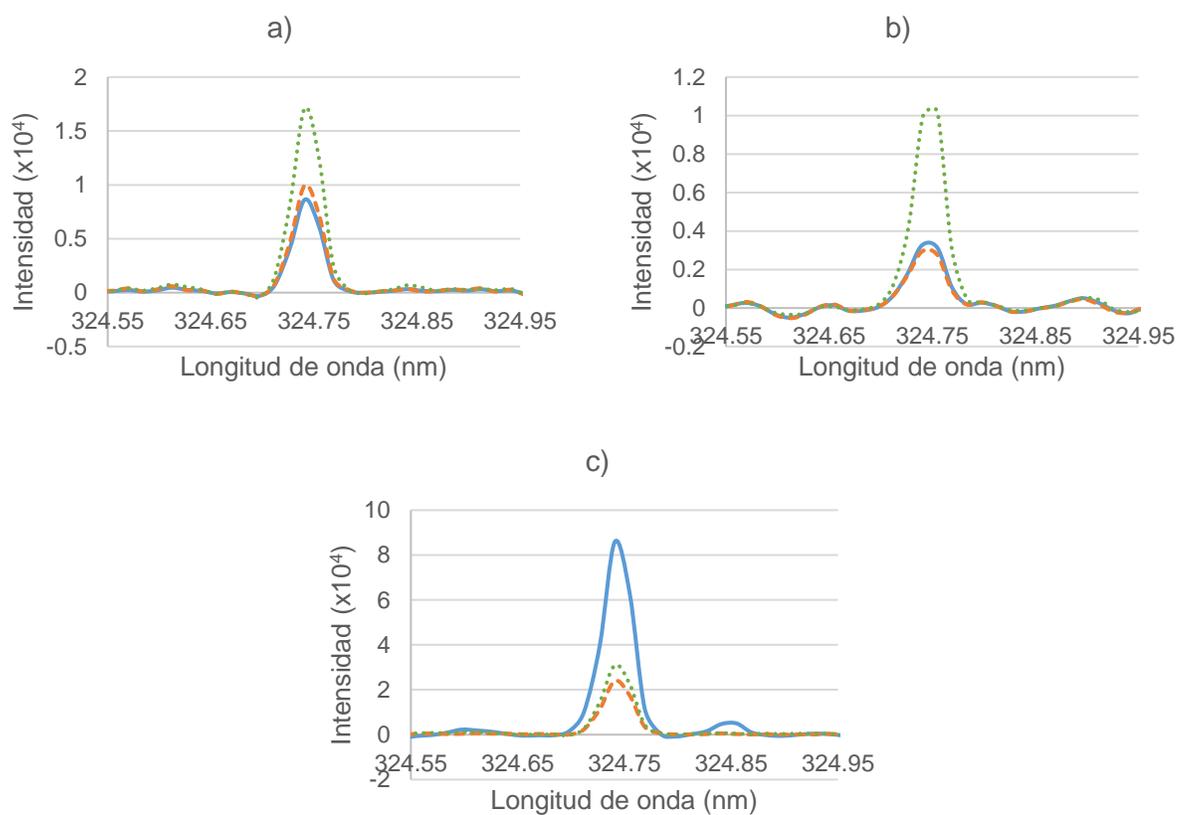


Figura 13. Espectros de emisión atómica de Cu para tres diferentes muestras de a) propóleo crudo: M1 (—), M2 (---), M4 (····), b) tinturas: M3 (—), M1 (---), M2 (····) y c) residuos sólidos de extracción: M3 (—), M1 (---), M2 (····).

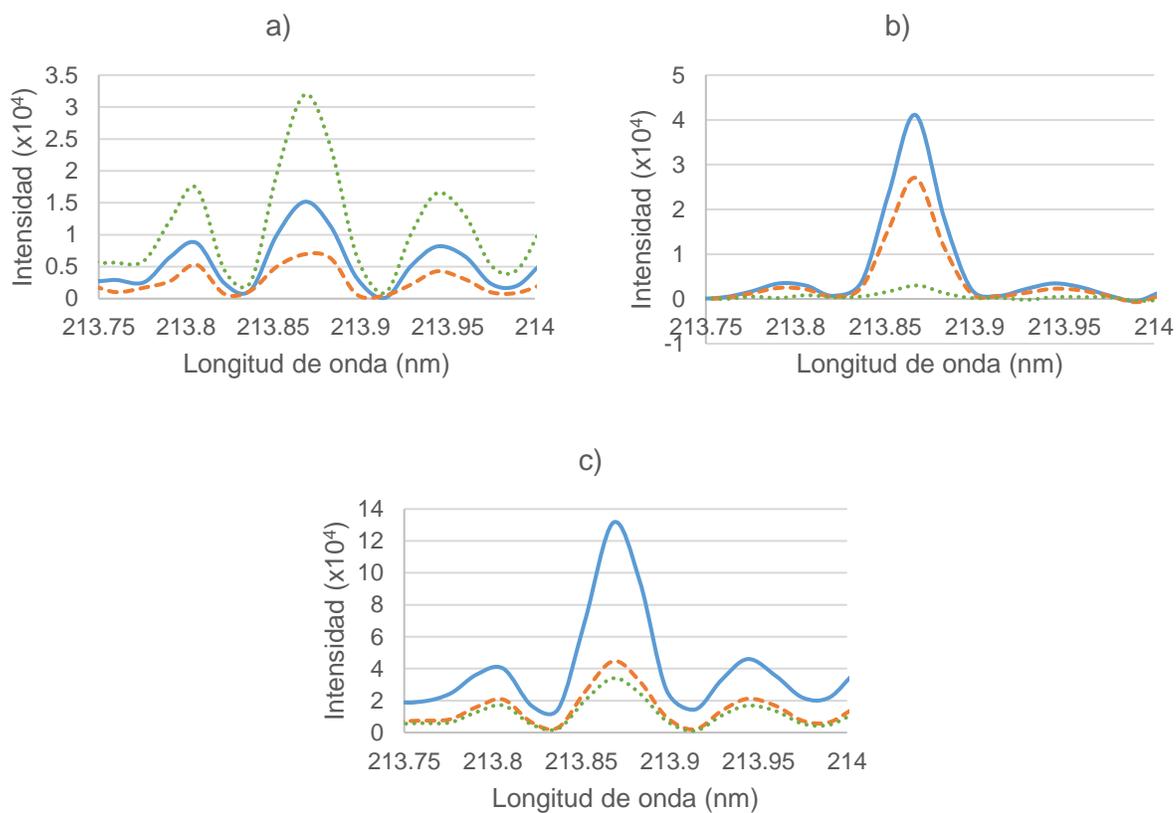


Figura 14. Espectros de emisión atómica de Zn para tres diferentes muestras de a) propóleo crudo: M1 (—), M2 (---), M4 (····), b) tinturas: M3 (—), M1 (---), M2 (····) y c) residuos sólidos de extracción: M3 (—), M1 (---), M2 (····).

Sensibilidad

La evaluación de esta característica de desempeño se basó en la elección de la longitud de onda de emisión más intensa, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos (Condiciones Instrumentales). Por ejemplo, en los casos de Ca y K; se observó que, cuando se registró la emisión a una longitud de onda de menor intensidad (figuras 15a y 16a) hubo una disminución de las pendientes de las respectivas curvas de calibración (figuras 15b y 16b).

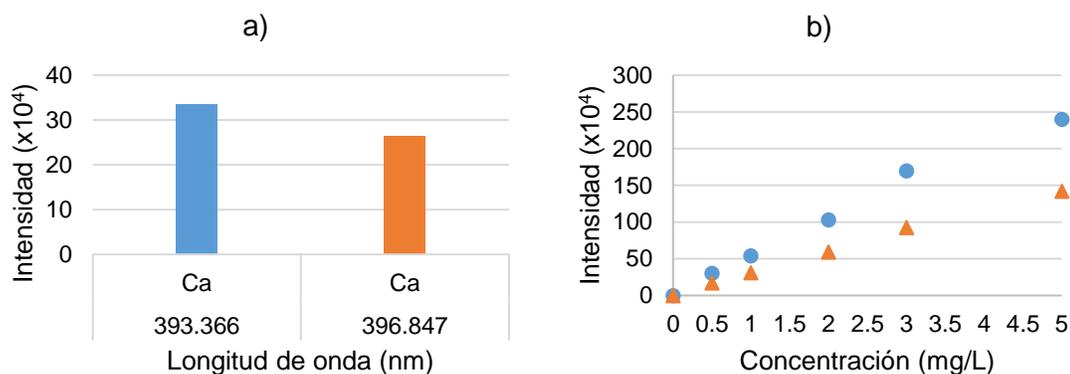


Figura 15. Intensidad de emisión (a) y curvas de calibración (b) de Ca a 393.366 nm (●) y 396.847 (▲) nm.

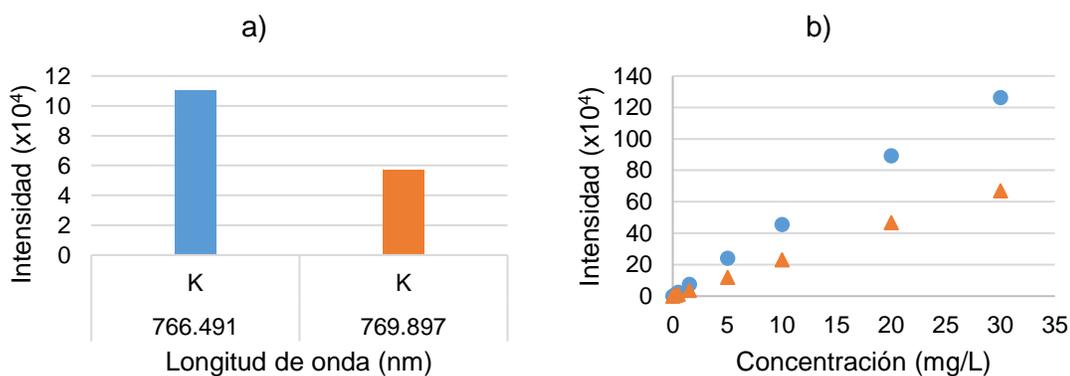


Figura 16. Intensidad de emisión (a) y curvas de calibración (b) de K a 766.491 nm (●) y 769.897 (▲) nm.

El cambio de la longitud de onda a una de menor intensidad permite tener rangos lineales más amplios, lo que permite medir concentraciones más altas y así evitar el uso de diluciones que introduzcan error en los análisis. En la figura 17 se comparan dos longitudes de onda del Ca (396.847 y 646.257 nm). Se observa que con la longitud de onda de menor intensidad de emisión (646.257 nm, figura 17a) se alcanza un intervalo de concentraciones más amplio (0-30 mg·L⁻¹) (figura 17b).

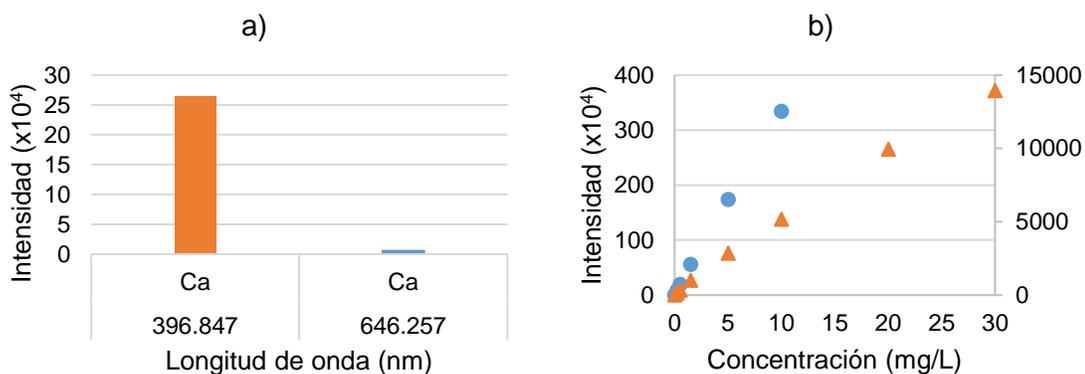


Figura 17. Intensidad de emisión (a) y curvas de calibración (b) de Ca a 396.847 nm (●) y 646.257 (▲) nm.

Efecto del contenido de etanol en la sensibilidad

Las tinturas de propóleo pueden introducirse directamente al nebulizador del MP-AES; sin embargo, la mayoría de las tinturas comerciales no reporta la concentración de etanol que contienen. Por lo tanto, para analizar de qué forma afecta el contenido de etanol en la sensibilidad, se evaluó estadísticamente el efecto del etanol en el intercepto y en la pendiente de las curvas de calibración. Las concentraciones estudiadas fueron 0%, 10%, 70%, 80%, 90% y 100% v/v de etanol. Este intervalo de concentraciones se escogió porque se ha reportado en la preparación de tinturas (Park y Ikegaki, 1998; Trusheva, Trunkova, y Bankova, 2007) y porque se considera que es el posible contenido de etanol en las tinturas comerciales.

Se observó que conforme la concentración de etanol aumentaba, la señal analítica también tendía a aumentar, de tal forma que para la mayoría de los analitos la curva con 100% de etanol fue la que tuvo mayor sensibilidad. Este efecto de la matriz resultaría benéfico pues permitiría disminuir los límites de detección y de cuantificación, dependiendo del elemento. En las figuras 18 y 19 se muestran como ejemplos los casos de Ba y Fe, respectivamente.

El análisis estadístico de las pendientes mostró que, para la mayoría de los elementos, las curvas de calibración con 70%, 80% y 90% v/v de etanol no presentaron diferencias significativas. El análisis de los interceptos mostró que, con excepción de pocos casos, todas las curvas de calibración incluyeron al cero, lo que indica que en ausencia de señal analítica el modelo estimó correctamente una concentración igual a cero (Anexo: comparación de curvas de calibración).

El efecto de aumento de la señal puede deberse a que la presencia de etanol provoca variaciones en la temperatura y en la densidad electrónica que afectan los procesos de atomización y ionización (Qiu, Ai, Lin, Wu, y Ye, 2007). También, se debe

considerar que cuando se utilizaron curvas de calibración con etanol se introdujo aire en el plasma para evitar el depósito de compuestos carbonados que pudieran dañar la antorcha.

Se ha documentado un efecto de disminución de la temperatura de excitación cuando se le agrega una corriente de O_2 al plasma de N_2 . Esta disminución provoca que haya un aumento en la intensidad de las líneas atómicas de emisión debido a un cambio en el equilibrio entre las densidades de las líneas atómicas e iónicas. Cuando la temperatura del plasma disminuye (por efecto del O_2 en el plasma), la densidad atómica domina el cambio de equilibrio entre las densidades atómicas e iónicas. El efecto de incremento de la densidad atómica es superior al decremento de la temperatura, por lo tanto, se observa un incremento en la señal de las líneas atómicas de emisión (Ohata, Ota, Fushimi, y Furuta, 2000). La disminución de la temperatura del plasma se explica porque las energías de ionización de la molécula de oxígeno son inferiores a las de la molécula de nitrógeno y, por lo tanto, se espera que las moléculas de oxígeno se disocien y se ionicen más fácilmente. El oxígeno actúa como un buffer en el plasma, reduciendo la energía cinética de los electrones resultantes que colisionan con los átomos de la muestra para ser excitados (Maeda y Wagatsuma, 2005).

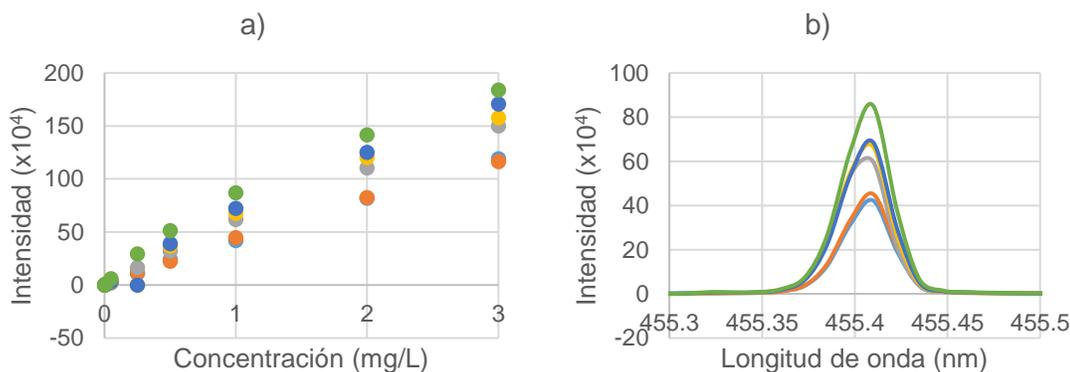


Figura 18. Curvas de calibración (a) y espectros de emisión (b) de Ba ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a diferentes concentraciones de etanol (●, — 0%; ●, — 10%; ●, — 70%; ●, — 80%; ●, — 90%; ●, — 100% v/v de etanol).

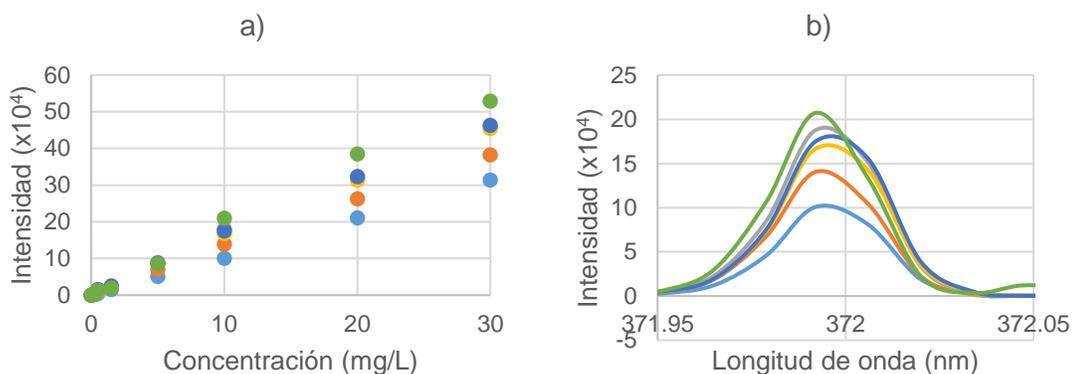


Figura 19. Curvas de calibración (a) y espectros de emisión (b) de Fe ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a diferentes concentraciones de etanol (●, — 0%; ●, — 10%; ●, — 70%; ●, — 80%; ●, — 90%; ●, — 100% v/v de etanol).

LoD y LoQ instrumentales

En las tablas 14 y 15 se reportan los límites de detección y cuantificación para los elementos minoritarios y mayoritarios, respectivamente. Se observan cinco LoD y cinco LoQ para cada analito, que corresponden a los valores calculados en curvas de calibración preparadas a diferentes concentraciones de etanol.

Tabla 14. Límites de detección y cuantificación instrumentales de los elementos minoritarios ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Elemento	Concentración de etanol en la curva										Cvek et al., 2008 ¹	Finger et al., 2014 ³	Pierini, Granero, Di Nezio y Centurión 2013 ⁴			
	0%		10%		70%		80%		100%				LoD	LoQ	LoD	LoQ
	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ						
Al	103.3	344.2	8.2	27.2	19.7	65.7	24.7	82.2	21.4	71.4	0.3	13600				
As	40222	134074	2017	6722	754	2514	924	3080	3815	12717	0.2 ²					
Ba	6.2	20.5	0.1	0.3	0.2	0.6	0.2	0.6	8.2	27.4	0.09					
Cd	1148	3828	8.3	27.6	5.3	17.7	4.9	16.2	26.7	89.0	0.05 ²	0.07 ²				
Co	6696	22320	16.1	53.5	20.2	67.4	25.0	83.4	1017	3391						
Cr	320	1067	0.5	1.6	0.7	2.5	0.7	2.3	27.5	91.7	4.0	2.06 ²				
Cu	98.6	328	1.6	5.5	1.7	5.8	1.5	5.1	7.0	23.2	0.5	390				
Mn	58.9	196	3.4	11.4	4.6	15.2	3.8	12.7	24.2	80.8	0.1	120				
Ni	848	2827	26.4	88.0	18.4	61.3	11.7	39.1	337	1123	6.0					
Pb	94105	313684	372	1239	165	549	804	2679	232	775	0.3 ²	3.73 ²	0.6	1.84		
Se	34302	114342	299	997	140	467	144	479	738	2462						
Sr	5.8	19.2	0.3	0.9	0.5	1.7	0.3	1.0	6.2	20.6	0.05					
Zn	3222	10740	69.5	232	13.9	46.2	13.2	44.0	75.9	253	0.3	410				

¹: ICP-AES

²: GFAAS

³: FAAS

⁴: Electroanálisis con electrodos de bismuto.

Tabla 15. Límites de detección y cuantificación instrumentales de los elementos mayoritarios ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Elemento (λ)	Concentración de etanol en la curva										Cvek et al., 2008 ¹	Finger et al., 2014 ²	Santana, Almeida, Jabor, Almeida y Chung, 2008 ²
	0%		10%		70%		80%		100%				
	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ			
Ca (396.847)	1.4	4.8	1.8	5.9	1.8	6.1	1.9	6.2	2.0	6.8	0.03	150	20
Ca (646.257)	198	660	216	720	292	973	261	871	2307	7690			
Fe	9.2	30.5	12.6	42.1	14.0	46.7	13.1	43.8	58.5	195	0.5		
K (766.491)	3.3	11.1	3.4	11.3	4.0	13.3	4.9	16.2	9.4	31.4	10.0	280	
K (769.897)	4.7	15.8	5.7	19.1	4.6	15.2	5.5	18.2	14.2	47.4			
Mg	2.1	7	3.3	11.2	2.9	9.8	3.3	11.0	2.9	9.7	0.03	60	3
Na	1.2	4.1	1.3	4.3	1.5	4.9	1.8	6.0	2.7	9.0	2.00	290	

λ : longitud de onda de emisión, nm.

¹: ICP-AES

²: FAAS

Los LoD y los LoQ de la mayoría de los elementos minoritarios tienden a disminuir cuando aumenta la concentración de etanol (hasta 80%), en tanto que los límites de los elementos mayoritarios tienden a permanecer constantes. Sin embargo, en ambos casos, se observa un aumento de LoD y LoQ cuando el contenido de etanol es de 100%. Este comportamiento; contrario a lo esperado, pues idealmente se deberían tener límites más bajos cuando la concentración de etanol es mayor ya que la pendiente de la curva aumenta, se puede explicar por un incremento en la señal de fondo originado por el solvente y que no pudo ser contrarrestado por la cantidad de aire que se introdujo en el sistema (se aplicó un nivel medio de introducción de aire para todas las curvas).

En comparación con los LoD (0% etanol) obtenidos por MP-AES, en otro análisis de propóleo crudo, donde se empleó ICP-AES y GFAAS, Cvek et al. (2008) reportaron LoD menores para Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb Sr, Ca, Fe, Mg y Zn, y mayores para K y Na. En contraste, Finger et al. (2014) reportaron LoD mayores para Al, Cu, Mg, Mn, Zn, Ca, Na y K; y menores para Cr, Cd y Pb, con FAAS y GFAAS. Adicionalmente, en un análisis de tinturas (Santana et al., 2008) con FAAS, los LoD para Ca y Mg, en ausencia de etanol, fueron menores a los que se obtuvieron por MP-AES. En términos generales, los LoD y los LoQ obtenidos con MP-AES son menores que los obtenidos con FAAS; pero mayores que cuando se emplean ICP-AES y GFAAS (tablas 14 y 15).

Adicionalmente, el LoD y el LoQ del Pb determinados por Pierini et al. (2013) con electroanálisis con electrodos de bismuto fueron menores a los obtenidos por MP-AES; sin embargo, es importante señalar que ésta es una técnica más versátil y rápida que la técnica empleada en dicho estudio. Además, MP-AES permite determinar más de 10 elementos químicos de manera simultánea, a diferencia de la técnica mencionada, que solo permite uno.

Por otro lado, los altos valores de los LoD y los LoQ de As y Se pueden mejorarse mediante el uso de técnicas más sensibles como la generación de hidruros, por lo que en el caso específico de estos elementos se recomienda el uso de esta técnica, la cual también puede realizarse por MP-AES con mejores rangos lineales que con FAAS y con la ventaja de que la determinación de los analitos es simultánea (Bulska y Tschopel, 1993), lo cual agiliza los análisis.

Con base en los resultados anteriores, la técnica MP-AES resultó útil para la determinación de los elementos mayoritarios y algunos elementos minoritarios en propóleo crudo y tinturas. Adicionalmente, es importante mencionar que hasta el momento no hay reportes que evalúen el efecto del etanol en el análisis por MP-AES.

Rango lineal y de trabajo

Los intervalos que se evaluaron fueron de 0-3 mg·L⁻¹ para los elementos minoritarios y de 0-30 mg·L⁻¹ para los mayoritarios.

La inspección visual de las curvas de calibración acuosas (0% v/v de etanol) y etanólicas (10, 70, 80, 90 y 100% v/v de etanol) mostró que el rango de trabajo cubrió el intervalo completo de éstas para todos los analitos, con excepción del Mg y el Na. Los intervalos de trabajo y lineales fueron, en el caso del Mg, de 0-20 mg·L⁻¹ para las curvas de 10, 70 y 100% v/v de etanol; y en el caso del Na, de 0-10 mg·L⁻¹ para las curvas de 10, 70, 80 y 90% v/v de etanol y de 0-5 mg·L⁻¹ para la curva de 100% v/v de etanol. Los intervalos fueron más pequeños porque a concentraciones superiores las señales fueron elevadas y estuvieron fuera del rango de lectura del instrumento. Lo anterior se debió al efecto de aumento de la señal analítica que ocurre en presencia de etanol y que se explicó en el apartado Efecto del contenido de etanol en la sensibilidad analítica.

El análisis de regresión lineal de las curvas de calibración acuosas en el rango de trabajo establecido mostró coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.997 para todos los analitos; excepto para el As (0.9513), Pb (0.9268) y Se (0.9257) ya que, como se mencionó anteriormente, la técnica empleada no fue la adecuada y debe emplearse la generación de hidruros. Para las curvas de calibración etanólicas, los valores de R^2 fueron, en general, inferiores a los obtenidos en las curvas de calibración acuosas. Los valores de R^2 para la curva de calibración con 10% v/v de etanol fueron superiores a 0.9951; excepto para el As (0.9635), Mg (0.9884), Pb (0.9682) y Se (0.9825). En el caso de la curva de calibración con 70% v/v de etanol se obtuvieron valores de R^2 superiores a 0.9901; excepto para el As (0.9849), K (0.9849) y Mg (0.9700). Las curvas de calibración con 80, 90 y 100% v/v de etanol mostraron valores de R^2 superiores a 0.9632, 0.9513 y 0.9211, respectivamente. Este comportamiento pudo deberse al aumento de la señal de fondo provocado por el etanol y que, como se mencionó en el apartado anterior, no pudo ser contrarrestado por la cantidad de aire (nivel medio) que se introdujo en el sistema.

La linealidad también se evaluó a través del análisis de las gráficas de residuales de cada curva, en las cuales se apreció una distribución al azar, lo cual confirma que existe una correlación lineal entre las variables. En las figuras 20-23 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de calibración acuosas y las gráficas de residuales correspondientes de Fe, K (769.897 nm), Co y Sr.

De lo anterior se concluyó que el As, Pb y Se no se comportan linealmente en el rango de trabajo. Para todos los demás elementos el rango de trabajo y el lineal coincidieron, con excepción de los casos ya mencionados.

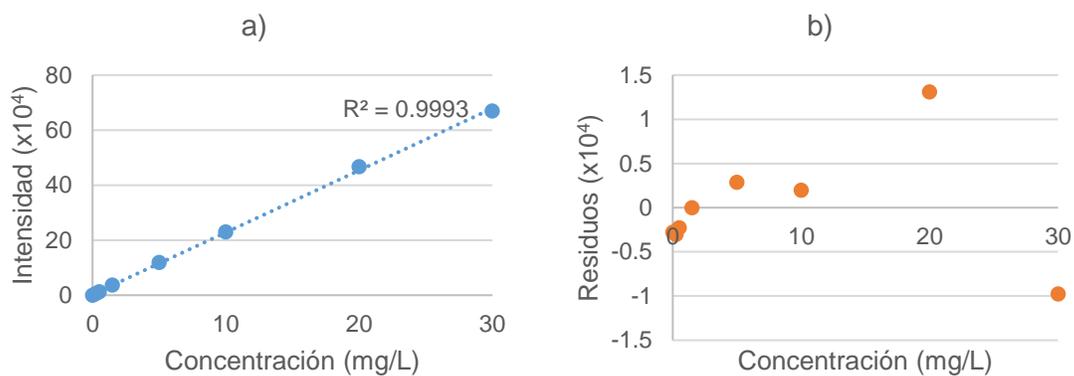


Figura 20. Curva de calibración (a) y gráfica de residuales (b) de Fe.

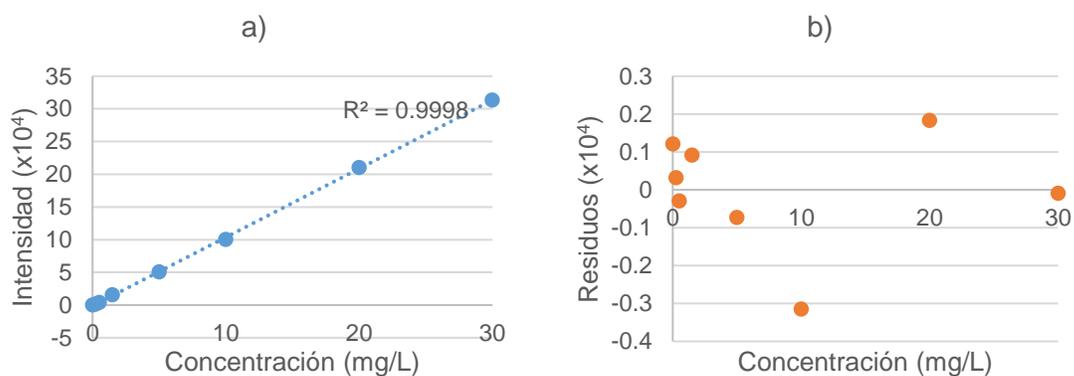


Figura 21. Curva de calibración (a) y gráfica de residuales (b) de K (769.897 nm).

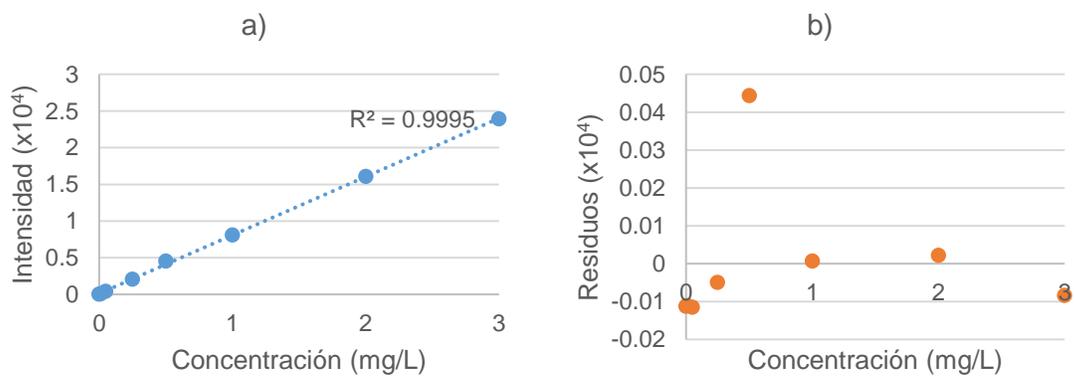


Figura 22. Curva de calibración (a) y gráfica de residuales (b) de Co.

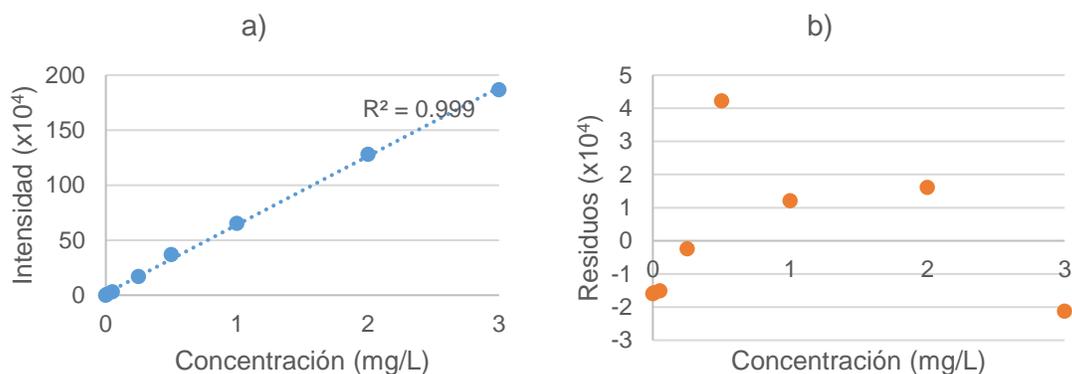


Figura 23. Curva de calibración (a) y gráfica de residuales (b) de Sr.

Exactitud y precisión (repetibilidad)

En la tabla 16 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos, junto con su desviación estándar (SD) y RSD, de los elementos adicionados al propóleo (Cd, Cr, Fe, Ni, Pb y Zn). Se eligieron estos elementos porque se han establecido límites máximos permitidos (LMP) para estos. El propóleo se fortificó a dos niveles de tal manera que se alcanzara una concentración final equivalente a 50 y 150 veces el LMP de cada elemento. Cuatro (Cr, Fe Ni y Pb) de los seis elementos tuvieron porcentajes de recuperación superiores al 80% y RSD menores al 35%. En el caso del Cd y el Zn las recuperaciones fueron menores al 35% y los valores de RSD fueron mayores al 12%.

Los bajos porcentajes de recuperación y la elevada variabilidad del Cd pudieron deberse a la baja concentración del elemento en el propóleo fortificado. En el caso del Zn, a la baja sensibilidad para este elemento ya que sus límites de detección y de cuantificación fueron relativamente altos.

Los elementos que cumplieron con el criterio de aceptación de la exactitud (90-110%) fueron el Cr y el Fe. Respecto a la precisión, en todos los casos fue mejor para el nivel de fortificación 150; sin embargo, únicamente el Cr, Fe, Ni y Pb cumplieron con el criterio de aceptación ($\leq 10\%$)

En otro estudio (Cvek et al., 2008) donde se utilizó la digestión asistida por microondas y la FAAS para digerir y analizar las muestras de propóleo crudo, respectivamente, se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 100%, excepto para el Cd (78.90%) y el Pb (78.70%), que fueron analizados con GFAAS, y valores de RSD menores a 6%.

Tabla 16. Concentración y porcentajes de recuperación promedio (n = 3) de los analitos en propóleo crudo fortificado.

Elemento	Nivel de fortificación	Concentración (mg·kg ⁻¹)		Recuperación (%) ± SD	RSD (%)
		Adicionada	Determinada		
Cd	50	0.5	0.2	31.71 ± 8.78	27.67
	150	1.5	0.3	16.40 ± 3.33	20.30
Cr	50	7.5	6.7	88.70 ± 11.08	12.49
	150	22.5	21.8	96.85 ± 0.57	0.59
Fe	50	200	195.4	97.69 ± 11.02	11.28
	150	600	541.9	90.57 ± 4.03	4.45
Ni	50	0.5	0.8	167.78 ± 54.79	32.66
	150	1.5	1.3	87.53 ± 2.15	2.45
Pb	50	50	78.7	157.43 ± 18.77	33.25
	150	150	183.4	122.26 ± 4.01	3.28
Zn	50	150	29.9	19.94 ± 3.63	18.18
	150	450	59.7	13.26 ± 1.63	12.26

En la tabla 17 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos, junto con su SD y RSD, de los elementos en tinturas fortificadas directamente y tinturas preparadas a partir de propóleo fortificado.

Los porcentajes de recuperación fueron, en términos generales, mayores en las tinturas fortificadas (84.98-135.53%) que en las tinturas preparadas a partir de propóleo fortificado (8.86-100.82%). Esto puede explicarse porque la mayoría de los elementos no son capaces de transferirse desde el propóleo al etanol, lo cual a su vez puede deberse a la formación de complejos metálicos con los flavonoides y ácidos fenólicos presentes naturalmente en el propóleo (Park y Ikegaki, 1998), y a la baja solubilidad de las sales de los elementos en el solvente.

Respecto a la variabilidad se puede afirmar que fue aceptable, pues se aprecia que la mayoría de los valores de RSD son inferiores a 10%.

En general, no se cumplió el criterio de aceptación de exactitud (90-110%), pero sí el de precisión (RSD ≤ 10%) para la mayoría de los elementos. No obstante, los casos los valores obtenidos pueden considerarse relativamente aceptables. Cabe destacar que actualmente no existen reportes donde se desarrolle y valide algún método para la determinación de metales en tinturas de propóleo.

Tabla 17. Concentración y porcentajes de recuperación promedio de los analitos en tinturas fortificadas (TF) y tinturas preparadas a partir de propóleo fortificado (TPF) (n = 3).

Elemento	Nivel de fortificación	Tintura	Concentración (mg·L ⁻¹)		Recuperación (%) ± SD	RSD (%)
			Adicionada	Determinada		
Cd	50	TF		0.14	85.05 ± 2.52	2.96
		TPF	0.17	0.10	58.38 ± 2.22	3.81
	150	TF		0.51	102.83 ± 2.20	2.14
		TPF	0.50	0.32	64.73 ± 6.48	10.02
Cr	50	TF		2.83	113.30 ± 0.45	0.40
		TPF	2.50	1.02	40.94 ± 2.32	5.66
	150	TF		8.64	115.14 ± 2.16	1.88
		TPF	7.50	4.79	63.89 ± 1.57	2.45
Fe	50	TF		66.28	99.43 ± 2.81	2.82
		TPF	66.67	12.58	18.87 ± 2.85	15.11
	150	TF		174.12	87.06 ± 1.53	1.76
		TPF	200.00	115.32	57.66 ± 0.95	1.64
Ni	50	TF		0.23	135.53 ± 3.32	2.45
		TPF	0.17	0.17	100.82 ± 42.45	42.10
	150	TF		0.50	100.64 ± 1.18	1.17
		TPF	0.50	0.29	57.30 ± 7.77	13.56
Pb	50	TF		16.68	100.07 ± 1.12	1.11
		TPF	16.67	2.25	13.49 ± 1.30	9.65
	150	TF		42.49	84.98 ± 0.93	1.10
		TPF	50.00	22.93	45.87 ± 2.79	6.08
Zn	50	TF		ND	NA	NA
		TPF	50.00	8.33	16.65 ± 5.14	30.84
	150	TF		ND	NA	NA
		TPF	150.00	13.29	8.86 ± 4.17	47.08

Determinación de metales

Propóleo crudo, tintura control, residuo sólido

En la tabla 18 se muestran las concentraciones promedio de los elementos en cuatro diferentes muestras de propóleo crudo (M1, M2, M3 y M4). Es importante mencionar que en los casos del Ca y K se reportan los valores obtenidos con las

longitudes de onda 646.257 nm y 769.897 nm, respectivamente, ya que tuvieron un rango lineal más amplio y mejores límites de detección y cuantificación.

Tabla 18. Concentración promedio (n = 3) de los analitos en diferentes muestras de propóleo crudo.

Elemento	Concentración (mg·kg ⁻¹) ± SD (RSD, %)			
	Mocochá (M1)	Mérida (M2)	Querétaro (M3)	Tizimín (M4)
Al	112.84 ± 24.68 (21.87)	186.02 ± 2.45 (1.31)	266.32 ± 12.89 (4.84)	238.10 ± 9.08 (3.81)
Ba	11.50 ± 0.36 (3.11)	12.81 ± 2.47 (19.31)	6.12 ± 0.20 (3.26)	23.31 ± 0.16 (0.68)
Ca	2132.82 ± 268.33 (12.58)	2123.93 ± 72.05 (3.39)	760.72 ± 15.14 (1.99)	1980.79 ± 23.24 (1.17)
Cd	< LoQ	< LoD	< LoD	< LoD
Co	< LoQ	< LoD	< LoD	< LoD
Cr	< LoQ	< LoD	< LoD	< LoD
Cu	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
Fe	75.35 ± 12.52 (16.61)	89.78 ± 4.15 (4.62)	270.77 ± 2.98 (1.10)	216.75 ± 46.71 (21.97)
K	1494.52 ± 345.14 (23.09)	2836.23 ± 205.96 (7.26)	611.18 ± 38.16 (6.24)	848.90 ± 123.72 (14.57)
Mg	1560.53 ± 185.46 (11.88)	1725.55 ± 87.22 (5.05)	215.87 ± 5.23 (2.42)	1037.94 ± 1.25 (0.12)
Mn	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
Na	300.24 ± 72.96 (24.30)	1140.60 ± 29.21 (2.56)	61.02 ± 1.30 (2.13)	770.24 ± 20.80 (2.70)
Ni	< LoQ	< LoD	< LoD	< LoD
Pb	< LoQ	< LoD	< LoD	< LoD
Sr	68.68 ± 3.82 (5.56)	9.65 ± 0.91 (9.44)	5.51 ± 0.12 (2.19)	297.33 ± 2.30 (0.77)
Zn	548.39 ± 20.13 (3.70)	< LoD	< LoD	< LoD

LoD: límite de detección.

LoQ: límite de cuantificación.

El contenido mineral del propóleo está directamente relacionado con su origen. Estudios previos indican que existe una fuerte relación entre el contenido de los diferentes elementos en los productos apícolas y en el medio que los rodea, principalmente por la influencia de las plantas, suelo, humedad, etc. (Roman, Popiela, y Dobrzanski, 2011). Otro aspecto que influye en la composición del propóleo es el metabolismo y la función del propóleo en la vida de la abeja (Alić et al., 2016). El método

de recolección también es una fuente importante de variación, sobre todo de metales tóxicos (Sales et al., 2006).

La concentración de Al en las cuatro muestras de propóleo crudo fue relativamente alta. Aunque las cantidades obtenidas de Al fueron del mismo orden de magnitud, las muestras de Querétaro y Tizimín tuvieron una concentración ligeramente superior (tabla 18). El contenido de Al en el propóleo de Mocochoá ($112.84 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Mérida ($186.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) fue parecido a lo reportado en propóleo de Croacia ($153.9\text{-}604.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Galicia ($105.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Serbia ($60\text{-}159 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); a su vez, la cantidad de Al en propóleo de Querétaro ($266.32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Tizimín ($238.10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) fue similar al aluminio cuantificado en Castilla-León ($213.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Turquía ($200\text{-}1400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Sin embargo, las concentraciones de Al en este trabajo fueron inferiores a lo determinado en Andalucía ($395\text{-}496 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); China ($971.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Chile ($354.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Bonvehí y Bermejo, 2013; Cvek et al., 2008; Gong et al., 2012; González-Martín et al., 2015; Aksoy, Atabay, Tirasoglu, Koparan, y Kekillioglu, 2017; Tosic, Stojanovic, Mitic, Pavlovic, y Alajic, 2017).

El alto contenido de Al en las muestras de propóleo puede explicarse por la concentración de este elemento en el suelo. Se han reportado concentraciones de $19\text{-}119 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y de $25\text{-}375 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Al en los suelos de Yucatán y Querétaro, respectivamente, las cuales se deben a la presencia de minerales como halloysita ($\text{Al}_4(\text{SiO}_{10})(\text{OH})_8\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y boehmita ($\text{AlO}(\text{OH})$) (Muñoz-Sánchez J., Domínguez-Domínguez, y Hernández-Sotomayor, 2015; Robles et al., 2014).

Los niveles elevados de Al también están relacionados a sitios de recolección con suelos ácidos (Bonvehí y Bermejo, 2013). Se ha reportado que existe una relación entre el incremento del contenido de Al^{3+} y valores de pH inferiores a 5.5 (Muñoz-Sánchez J. et al., 2015). Los suelos de Yucatán se caracterizan por ser alcalinos o ligeramente alcalinos; y los de Querétaro son neutros; sin embargo, la aplicación intensiva de fertilizantes nitrogenados genera acidez residual (Borges-Gómez, Escamilla-Bencomo, Soria-Fregoso, y Casanova-Villareal, 2005; Robles et al., 2014) por lo que el propóleo pudo haber sido elaborado con materiales provenientes de zonas donde se usa este tipo de fertilizantes. Adicionalmente, Bonvehí y Bermejo (2013) señalan que las concentraciones elevadas de Al parecen ser inherentes al propóleo reflejando las variadas fuentes de recolección de las abejas para elaborar este producto. Recientemente, se vinculó el exceso de Al con enfermedades como el mal de Alzheimer (Campbell, 2002); sin embargo, sus efectos reales aún se desconocen. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria de $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal (pc) (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2007).

La cantidad de Ba en las cuatro muestras de propóleo fue relativamente baja. El contenido más alto de Ba se obtuvo en la muestra de Tizimín ($23.31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), seguida de las de Mérida ($12.81 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Mocochoá ($11.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); el propóleo de Querétaro presentó la menor cantidad de este elemento ($6.12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Estas concentraciones fueron mayores a las halladas por Andrade et al., (2013) que reportaron valores de $0.56\text{-}1.54 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; y menores, en general, a los encontrados por Cvek et al., (2008), cuyos valores fueron $5.4\text{-}124.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. El Ba está presente naturalmente en el suelo a concentraciones relativamente altas, siendo el 19° elemento más abundante en la Tierra (Suwan et al., 2008). También, se utiliza ampliamente en la industria del vidrio, cerámica, y de insecticidas; forma parte del polvo urbano y se ha reconocido como un valioso trazador para las emisiones vehiculares (Morgano et al., 2010). Si hay exposición a altas concentraciones de Ba en un periodo corto de tiempo se pueden presentar molestias gastrointestinales, debilidad muscular y alta presión sanguínea (Suwan et al., 2008). El Comité Científico de Salud y Riesgos Ambientales de la Unión Europea (SCHER, por sus siglas en inglés) recomienda una ingesta diaria de Ba de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de pc (Scientific Committee on Health and Environmental Risks, 2012).

El contenido de Sr fue relativamente bajo en todas las muestras, con excepción del propóleo de Tizimín que tuvo $297.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Las muestras de Querétaro, Mérida y Mocochoá tuvieron 5.51 , 9.65 y $68.68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente. En términos generales, las cantidades de Sr determinadas en este trabajo fueron similares o mayores a lo reportado por Cvek et al., (2008) ($1.2\text{-}32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Gong et al., (2012) ($8.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). El estroncio está presente en la corteza terrestre naturalmente en forma de minerales como celestita (SrSO_4) y estroncianita (SrCO_3). Se encuentra en el aire por procesos naturales como el desgaste de las rocas por el viento, arrastre de partículas de polvo, etc; o por actividades humanas como quema de carbón, uso de fertilizantes de fosfato y pirotecnia. Aunque las plantas no necesitan del estroncio pueden absorberlo del suelo a través de la ruta del calcio. Una vez que se ha absorbido puede trasladarse a otras partes de la planta como las hojas y los frutos (International Programme on Chemical Safety & Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, 2010). No se conocen efectos dañinos provocados por las sales de estroncio a niveles en los que normalmente se encuentran en el ambiente. La única forma que es dañina es el SrCrO_4 , pero lo es por el cromato y no por el estroncio. Pueden presentarse problemas óseos en niños si se ingieren cantidades inusualmente altas de estroncio, especialmente si la dieta es baja en calcio y proteína (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004). La OMS recomienda una ingesta diaria de estroncio de $0.13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de pc (International Programme on Chemical Safety & Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, 2010).

La concentración de Zn en el propóleo de Mocochoá ($548.39 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) fue relativamente elevado y comparable a lo reportado por Alić et al. (2016) ($11.2\text{-}728.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Bonvehí y Bermejo (2013) ($163\text{-}1364 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y Cvek et al. (2008) ($80\text{-}9325$

mg·kg⁻¹). Otros autores reportaron cantidades menores, desde 0.020 mg·kg⁻¹ (Bogdanov Popov, Karapetkovsk, Presilski, Shariati, y Najman, 2017) hasta 460.7 mg·kg⁻¹ (González-Martín et al., 2015). En las muestras de Mérida, Querétaro y Tizimín el contenido de Zn estuvo debajo del límite de detección. El Zn se utiliza en el recubrimiento de otros metales y puede estar presente en residuos industriales (Manahan, 2007). Es un elemento esencial que compone un gran número de enzimas, estabiliza la estructura celular contribuyendo de esta manera a la integridad de células y tejidos, y también tiene un rol importante en el proceso de expresión genética. Se recomienda una ingesta diaria de 59-72 µg·kg⁻¹ de pc (FAO/WHO, 2001) y, aunque no se considera tóxico, pueden presentarse síntomas como náuseas, vómitos, dolor epigástrico, letargia y fatiga si es ingerido en exceso (Fosmire, 1990).

Los demás elementos minoritarios (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb) estuvieron debajo de su límite de detección o cuantificación.

En el caso del Cd, la concentración en el propóleo de Mocochoá fue mayor que su LoD (1.15 mg·L⁻¹, 22.96 mg·kg⁻¹) y menor que su LoQ (3.82 mg·L⁻¹, 76.56 mg·kg⁻¹). En propóleo de España (0.038-0.102 mg·kg⁻¹) (Bonvehí y Bermejo, 2013), Polonia (0.008-0.889 mg·kg⁻¹) (Roman et al., 2011), (12.5-49.6 mg·kg⁻¹) (Formicki et al., 2013), Bosnia-Herzegovina (0.013-0.030 mg·kg⁻¹) (Bogdanov Popov et al., 2017), Italia (0.62-5.45 µg·kg⁻¹) (Conti y Botrè, 2001), China (0.6 mg·kg⁻¹) (Gong et al., 2012) y Turquía (1.695-19.388 mg·kg⁻¹) (Martin, Kargar, y Buyukisik, 2016) también se reportaron concentraciones inferiores al LoQ del elemento en este trabajo. Para las tres muestras restantes, el contenido de Cd estuvo debajo del LoD. El Cd se emplea en varios procesos industriales (como el recubrimiento de metales) y se encuentra en fertilizantes con fosfato (Sattler et al., 2016), por lo tanto, puede contaminar fuentes de agua y de propóleo que sirven como suplemento a las abejas. El envenenamiento agudo y crónico con Cd en humanos provoca tensión arterial alta, daños en el riñón, destrucción de tejido testicular y de glóbulos rojos (Manahan, 2007). Además, se ha comprobado que es un elemento carcinogénico. La OMS recomienda una ingesta diaria de 0.7 µg·kg⁻¹ de pc (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011).

Las concentraciones del Co (6.70-22.32 mg·L⁻¹, 133.92-446.40 mg·kg⁻¹), Cr (0.32-1.07 mg·L⁻¹, 6.40-21.34 mg·kg⁻¹), Ni (0.85-2.83 mg·L⁻¹, 16.96-56.52 mg·kg⁻¹) y Pb (94.11-313.68 mg·L⁻¹, 1882.10-6273.66 mg·kg⁻¹) en las cuatro muestras analizadas estuvieron entre sus límites de detección y cuantificación.

Para el Co y el Pb otros autores han reportado concentraciones menores: de 0.001 mg·kg⁻¹ (Liben, Atlabachew, y Abebe, 2018) a 1.90 mg·kg⁻¹ (Tosic et al., 2017); y de 0.031 mg·kg⁻¹ (Bogdanov Popov et al., 2017) a 640.02 mg·kg⁻¹ (Cvek et al., 2008), respectivamente. En los casos del Cr y el Ni las concentraciones reportadas fueron menores o similares: de 0.002 mg·kg⁻¹ (Conti y Botrè, 2001) a 48.9 mg·kg⁻¹ (González-

Martín et al., 2015); y de $0.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tosic et al., 2017) a $29.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (González-Martín et al., 2015), respectivamente. El origen de estos metales es, principalmente, la contaminación por residuos industriales, minería y combustibles (Manahan, 2007). El Cr es un elemento esencial, aunque es sumamente tóxico y carcinogénico como Cr (VI). El Co es esencial para los mamíferos, activa diversas enzimas y forma parte de la vitamina B12; sin embargo, es muy tóxico para las plantas y moderadamente tóxico cuando se inyecta por vía intravenosa a los mamíferos. El Ni también es un microelemento esencial, aunque es muy tóxico para la mayoría de las plantas y moderadamente tóxico y carcinogénico para los mamíferos. Por último, el Pb es sumamente tóxico para la mayoría de las plantas, y es un veneno acumulativo en los mamíferos. Uno de los síntomas de intoxicación con plomo es anemia. Afecta severamente el sistema nervioso central (Huheey, Keiter, y Keiter, 1997). Los límites máximos tolerables de ingesta diaria por kg de pc, recomendados por la OMS, para el Co, Cr, Ni y Pb son $100 \mu\text{g}$, $0.55 \mu\text{g}$, $11 \mu\text{g}$, $0.02\text{-}3.0 \mu\text{g}$, respectivamente (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011; FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2007).

Finalmente, en las cuatro muestras analizadas las concentraciones de Cu y Mn estuvieron por debajo de sus límites de detección: $0.099 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.98 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0.059 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los valores estimados del Cu y Mn fueron, generalmente, menores a los encontrados en propóleo de otras partes del mundo. De Cu se reportaron concentraciones de $0.018 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en Macedonia (Bogdanov Popov et al., 2017) a $870 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en Serbia (Tosic et al., 2017); de Mn, concentraciones de $0.228 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Maras, Sezgin, Taspinar, y Yuksek, 2017) a $2400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Aksoy et al., 2017), ambos estudios de Turquía. Estos elementos pueden provenir de desechos industriales, mineros y agrícolas (Manahan, 2007). Son esenciales para todos los organismos, constituyen numerosas enzimas. Sin embargo, a altas concentraciones son muy tóxicas para las plantas e invertebrados. El Cu es moderadamente tóxico para los mamíferos (Huheey et al., 1997). No existen evidencias de que el Cu y el Mn sea dañinos para el ser humano, no obstante, la OMS recomienda una ingesta diaria de 0.5 mg y $0.5 \mu\text{g}$, respectivamente, por kilogramo de pc (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011).

Los LMP establecidos por la Unión Europea para el Cd, Cr, Ni, Pb y Zn en propóleo son 0.01 , 0.15 , 0.01 , 1 y $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente (Di Bartolomeo et al.). Las concentraciones estimadas del Cr, Ni y Pb en las cuatro muestras analizadas fueron superiores a los LMP; al igual que la cantidad estimada de Cd en el propóleo de Mochochá. Se recomienda realizar más análisis para poder conocer las concentraciones con mayor exactitud. En cuanto al Zn, es posible afirmar que el contenido determinado en el propóleo de Mochochá es superior al LMP para este elemento. La elevada concentración de estos metales puede explicarse por las características físicas del propóleo, ya que es pegajoso y absorbe fácilmente a los contaminantes; también se debe a su contenido de compuestos fenólicos que acomplejan a los metales pesados (Martin et al., 2016).

Respecto a los elementos mayoritarios, los metales con las concentraciones más altas fueron el K (611.18-2836.23 mg·kg⁻¹), Mg (215.27-1725.55 mg·kg⁻¹) y Ca (760.72-2132.82 mg·kg⁻¹), al igual que en otros estudios donde, además, los valores determinados fueron, en general, de la misma magnitud de los de este trabajo. Para el K se reportaron valores de 101 mg·kg⁻¹ (Lima et al., 2009) a 54.9 g·kg⁻¹ (Finger et al., 2014); para el Mg, de 63.5 mg·kg⁻¹ (González-Martín et al., 2015) a 4650 mg·kg⁻¹ (Finger et al., 2014) y para el Ca, de 39 mg·kg⁻¹ (Lima et al., 2009) a 7600 mg·kg⁻¹ (Aksoy et al., 2017). Los tres elementos son esenciales para todos los organismos ya que desempeñan funciones importantes en el metabolismo celular, aunque el K puede considerarse un contaminante causado por la lixiviación de fertilizantes en tierras agrícolas (Huheey et al., 1997). La ingesta diaria recomendada por la OMS Ca, K y Mg es 700-1000 mg, 3510 mg y 220-260 mg, respectivamente (FAO/WHO, 2001; WHO, 2012).

Las concentraciones de Na y Fe fueron 61.02-1140.60 y 75.35-270.77 mg·kg⁻¹, respectivamente. En comparación, las concentraciones reportadas por otros autores para estos dos elementos fueron, respectivamente: de 5.23 mg·kg⁻¹ a 14.5 g·kg⁻¹ (Andrade et al., 2013; Aksoy et al., 2017) y de 21 a 2509.48 mg·kg⁻¹ (Andrade et al., 2013; Cvek et al., 2008). Ambos elementos son esenciales. El Na es importante para el funcionamiento nervioso de los animales, el Fe es componente de la hemoglobina, que se encarga de transportar el oxígeno en la sangre. El consumo excesivo de Na está asociado con ciertos tipos de hipertensión, mientras que el Fe puede provocar siderosis (enfermedad pulmonar) y hemacromatosis (almacenamiento excesivo de hierro en los órganos) (Huheey et al., 1997). La OMS recomienda ingerir diariamente 9.1-19.6 mg de Fe y menos de 2 g de sodio (FAO/WHO, 2001; WHO, 2012).

Las altas concentraciones de Ca, Fe, K, Mg y Na en el propóleo se deben a que son elementos comunes en el suelo y, por lo tanto, están presentes de manera importante en el metabolismo de las plantas.

Por otro lado, los valores de RSD para la mayoría de los elementos en el propóleo crudo estuvieron por debajo del 20%, lo que indica una repetibilidad aceptable, aunque fueron mayores a lo reportado en otros trabajos, donde se empleó ICP y FAAS como técnicas analíticas: 0.51-21.67 (Cvek et al., 2008), 1.4-8.8 (Gong et al., 2012), 0.00-7.1 (Conti y Botrè, 2001).

Las concentraciones promedio de los elementos en el propóleo crudo de Mocochoá, una tintura elaborada a partir de él y el residuo sólido resultante aparecen en la tabla 19.

Tabla 19. Concentración promedio de los analitos en propóleo crudo (M1), tintura control y residuo sólido de extracción (n = 3).

Elemento	Concentración (mg·kg ⁻¹) ± SD (RSD, %)		
	Propóleo	Tintura*	Residuo
Al	112.84 ± 24.68 (21.87)	< LoQ	112.53 ± 4.19 (3.72)
Ba	11.50 ± 0.36 (3.11)	0.17 ± 0.12 (68.32) [0.06 ± 0.04 (68.62)]	11.32 ± 1.24 (10.97)
Ca	2132.82 ± 268.33 (12.58)	816.93 ± 138.20 (16.92) [274.51 ± 46.74 (17.03)]	1475.90 ± 196.97 (13.35)
Cd	< LoQ	0.08 ± 0.01 (7.08) [0.03 ± 0.002 (7.59)]	< LoQ
Co	< LoQ	< LoD	< LoQ
Cr	< LoQ	< LoQ	< LoQ
Cu	< LoD	< LoD	< LoD
Fe	75.35 ± 12.52 (16.61)	< LoD	71.38 ± 11.02 (15.44)
K	1494.52 ± 345.14 (23.09)	1138.54 ± 89.82 (7.89) [382.63 ± 31.78 (8.30)]	545.47 ± 160.49 (29.42)
Mg	1560.53 ± 185.46 (11.88)	1280.65 ± 109.29 (8.53) [430.43 ± 38.88 (9.03)]	736.07 ± 64.20 (8.72)
Mn	< LoD	0.71 ± 0.09 (13.27) [0.24 ± 0.03 (13.70)]	< LoD
Na	300.24 ± 72.96 (24.30)	154.57 ± 24.94 (16.14) [51.96 ± 8.63 (16.61)]	169.46 ± 30.27 (17.86)
Ni	< LoQ	< LoQ	< LoQ
Pb	< LoQ	< LoD	< LoQ
Sr	68.68 ± 3.82 (5.56)	7.40 ± 0.52 (7.04) [2.49 ± 0.18 (7.23)]	45.63 ± 4.29 (9.39)
Zn	548.39 ± 20.13 (3.70)	86.41 ± 2.52 (2.92) [29.04 ± 0.96 (3.32)]	425.75 ± 33.94 (7.97)

M1: Mocochoá, Yucatán.

*Los valores entre corchetes corresponden a la concentración en mg·L⁻¹

LoD: límite de detección.

LoQ: límite de cuantificación.

Actualmente, la literatura sobre determinación de metales en tinturas de propóleo es escasa. En un estudio relacionado (Cvek et al., 2008), utilizaron ICP-AES como técnica de análisis en tinturas de Croacia y reportaron valores de Mn (0.031-0.806 mg·L⁻¹) y Zn (4.042-186.040 mg·L⁻¹) que fueron relativamente similares a los obtenidos por MP-AES. Por el contrario, en ese mismo estudio se obtuvieron concentraciones menores de Ca (17.140-110.202 mg·L⁻¹), Cr (0 mg·L⁻¹), K (31.047-81.314 mg·L⁻¹), Mg

(0.772-3.013 mg·L⁻¹), Na (0.176-3.064 mg·L⁻¹), Ni (0 mg·L⁻¹) y Sr (0-0.197); y concentraciones mayores de Al (0.215-2.902 mg·L⁻¹), Ba (0.196-1.902 mg·L⁻¹), Cu (0.13-1.65 mg·L⁻¹) y Fe (0.758-6.538 mg·L⁻¹). Considerando los resultados obtenidos (tabla 17) se puede decir que las tinturas son inocuas y seguras para consumo humano ya que las cantidades de elementos peligrosos como el Cd (0.03 mg·L⁻¹), Co (< 0.0025 mg·L⁻¹), Cr (< 0.0023 mg·L⁻¹) y Pb (< 0.803 mg·L⁻¹) son relativamente bajas, aunque podrían aumentar durante el proceso de preparación de las tinturas.

Es importante destacar que el contenido de los elementos en la tintura fue menor que en el propóleo crudo, lo que significa que la mayoría de ellos no son extraídos por el etanol durante la preparación de las tinturas. También, se puede observar que la suma de la concentración de los elementos en la tintura y en el residuo sólido es aproximadamente igual a la concentración en el propóleo crudo, en la mayoría de los elementos, lo que indica que el tratamiento de la muestra fue el adecuado.

La gran variabilidad en las concentraciones de los elementos en el propóleo crudo y en las tinturas entre muestras de diferentes partes del mundo se debe, como ya se mencionó, a que por su naturaleza la composición del propóleo depende de las características de la vegetación, suelo y otros aspectos ambientales del área donde las abejas recolectan la materia prima para elaborar este producto.

En general, se puede afirmar que el consumo moderado de propóleo y tinturas no representa un peligro para la salud y que pueden considerarse como una buena fuente de elementos esenciales.

Determinación de etanol en tinturas comerciales

La presencia de etanol tiene un efecto de matriz positivo. Esto representa un problema en el análisis cuantitativo de los elementos pues podría llevar a resultados erróneos por no utilizar la curva de calibración adecuada. Es decir, si se utiliza una curva de calibración con diferente concentración de etanol a la de la muestra se podrían sub- o sobrestimar la concentración de los elementos, debido a la diferencia de pendientes. Por eso, es importante contar con un método para determinar el contenido de etanol en las tinturas comerciales, de esta forma se puede establecer cuál es la concentración de etanol con la que se debe preparar las curvas de calibración.

El método empleado consistió en la medición de la disminución de la absorbancia a 267 nm debido a la reducción de Cr⁶⁺ a Cr³⁺ por el etanol que se oxida a ácido acético:



Ya que se trata de un método indirecto, primero se analizó el efecto de los blancos de muestra sobre las absorbancias, por la posible presencia de sustancias reductoras del cromo que podrían afectar los resultados. Se empleó la evaporación por liofilización y al vacío para preparar dos de los tres tipos de blanco. La evaporación al vacío se utilizó porque es la que se reporta en el método original (Magrí et al., 1997), y la evaporación con liofilización porque permite la evaporación del etanol y, al mismo tiempo, mantiene la integridad de la muestra. El tercer tipo de blanco consistió en un blanco de reactivos y se evaluó porque fue simple y fácil de preparar. El ANOVA de una vía (tabla 20) mostró que no hay efecto estadísticamente significativo sobre la absorbancia entre los distintos niveles de preparación del blanco ($P < 0.05$).

Tabla 20. ANOVA de una vía para diferentes niveles de blanco.

Blanco	Absorbancia \pm SD
Liofilizado ¹	1.09 \pm 0.047 a
Vacío ¹	1.09 \pm 0.043 a
Acuoso ²	1.12 \pm 0.013 a

¹ promedio de 15 mediciones.

² promedio de 3 mediciones.

Letras distintas indican diferencia significativa.

Ya que los tres tipos de blanco fueron estadísticamente iguales, se eligió el blanco acuoso para los experimentos posteriores cuando se analizaron tinturas control y muestras reales. Además, dicho blanco presentó menor variabilidad, fue más fácil de preparar y se asemeja mejor a la matriz de la muestra, ya que ésta se encuentra altamente diluida, de tal manera que su contenido de etanol es de 0.1% v/v.

Para confirmar la identidad del analito con el método propuesto, en la figura 24 se comparan los espectros UV-vis de un blanco acuoso (a), una solución estándar de etanol (100%) (b), y tres tinturas control (40%, 80% y 100%) (c-e). En cada uno de los espectros se aprecian dos máximos de absorbancia, a 267 y 348 nm, que corresponden a la absorción del ion Cr^{6+} . En los espectros de la solución estándar de etanol (b) y las tinturas control (c-e), dichos máximos son menores respecto a los del blanco acuoso, debido a que el etanol reduce el Cr^{6+} a Cr^{3+} . Ya que la disminución de la absorbancia se presenta tanto en el material de referencia (solución estándar de etanol) como en las tinturas control, la disminución puede adscribirse a la presencia del analito (etanol).

Es importante mencionar que la absorbancia de la solución estándar de etanol al 100% es ligeramente mayor que la de la tintura preparada con 100% de etanol, lo cual se puede atribuir a la presencia de sustancias reductoras en esta última, lo que provoca

que más cantidad de cromo sea reducido y, por lo tanto, que la absorbancia de Cr^{6+} sea menor.

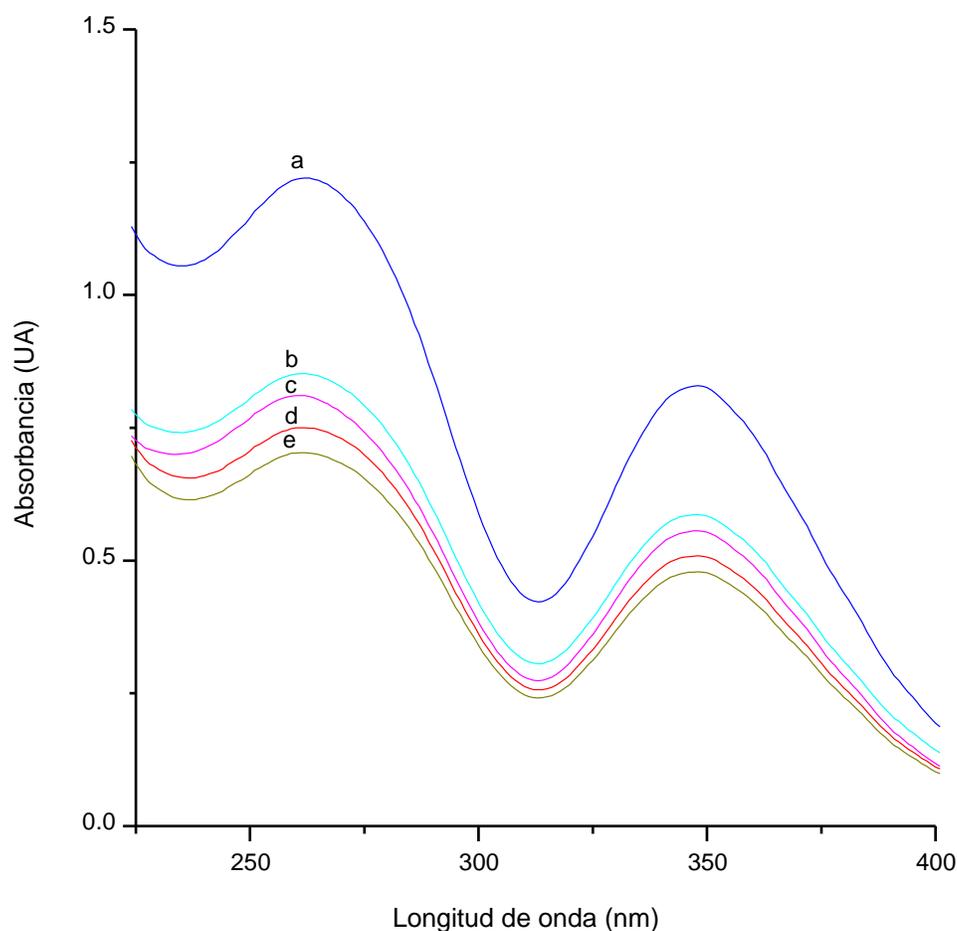


Figura 24. Espectros de a) blanco acuoso, b) solución estándar de etanol (100%), y tres tinturas control conteniendo: c) 100%, d) 80%, e) 40% de etanol.

Con el objetivo de evaluar la selectividad del método, se comparó la capacidad reductora de diferentes alcoholes con respecto a la del etanol. Se seleccionaron el metanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y n-pentanol; por su similitud con el etanol y por su posible presencia en las tinturas, ya que estos alcoholes son impurezas presentes en el etanol que se obtiene por fermentación (Secretaría de Salud, 1997) y que es el empleado en la preparación de tinturas comerciales (Bogdanov y Bankova, 2012). En la figura 25 se comparan los espectros UV-vis de un blanco acuoso, y de soluciones estándar de los alcoholes mencionados.

Para los seis alcoholes se aprecia una disminución de la absorbancia a 267 nm con respecto al blanco acuoso; sin embargo, la magnitud de la disminución no es la misma para todos, lo que significa que su capacidad reductora, o su facilidad de

oxidación, es ligeramente diferente. Se puede observar que el isopropanol, n-butanol y n-pentanol se oxidan con menos facilidad que el etanol (menor disminución de la absorbancia). Por otro lado, el metanol y el n-propanol se oxidan más fácilmente que el etanol (mayor disminución de la absorbancia). Estas diferencias se deben, principalmente, a la estructura química de los alcoholes (alcohol secundario, cadenas carbonadas de diferente longitud).

Por lo tanto, se establece una jerarquía según la facilidad de oxidación de los alcoholes, en orden decreciente: metanol > n-propanol > etanol > n-pentanol > n-butanol > isopropanol. Aunque el método no fue lo suficientemente selectivo puede emplearse porque la presencia de estos alcoholes en las tinturas es poco probable y, en caso de estar presentes, su contenido puede considerarse inferior al del etanol, ya que según la NOM-142-SSA1-1995; relativa a las especificaciones sanitarias para bebidas alcohólicas menciona que, en el alcohol etílico obtenido por fermentación, la concentración de metanol y alcoholes superiores (n-propanol, isopropanol, n-butanol y n-pentanol) no debe rebasar el 0.13% y 0.25% v/v, respectivamente, las cuales son considerablemente menores al etanol presente en la mayoría de las tinturas comerciales (< 30%).

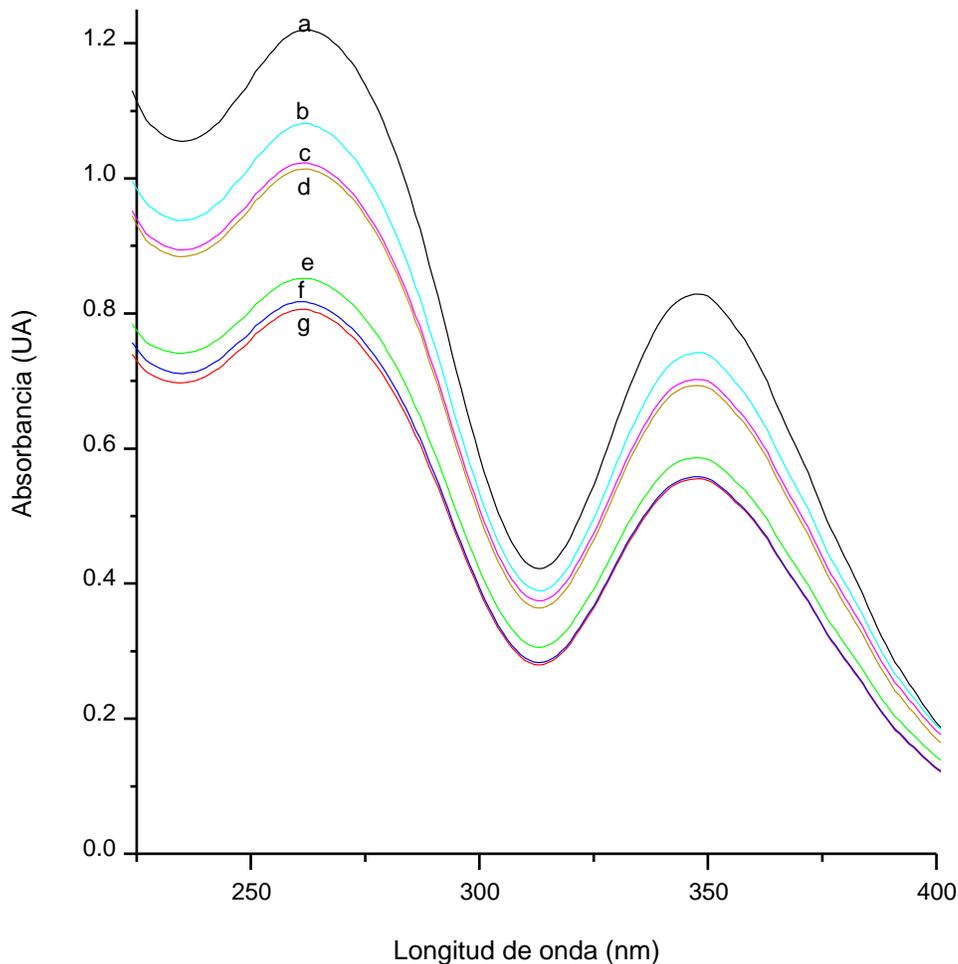


Figura 25. Espectros de a) blanco acuoso, y soluciones estándar de b) isopropanol, c) n-butanol, d) n-pentanol, e) etanol, f) n-propanol, g) metanol.

En la tabla 21 se presentan los porcentajes de recuperación, SD y RSD de seis soluciones estándar de etanol y tres tinturas control.

Algunos de los porcentajes de recuperación fueron relativamente bajos, en comparación con lo obtenido por Magrí et al. (1997) donde se reportaron valores superiores al 96%, cuando se analizaron bebidas alcohólicas comerciales como cerveza, vino y whisky. Lo anterior pudo deberse a la volatilización del analito, ya que las soluciones de análisis tienen una baja concentración de etanol (1% v/v) y la volatilidad relativa de éste es máxima a concentraciones de 0-31% v/v (Sundquist, Blanch, y Wilke, 1991). Aunque algunos de los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron fuera del criterio de exactitud (90-110%) establecido por la Directiva 96/23/CE (Funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, 2002) todos fueron superiores al 75%, por lo que se puede considerar que la exactitud es suficiente.

En cuanto a la precisión, los valores de RSD fueron inferiores al 10% y al 5% para las soluciones estándar y tinturas control, respectivamente. Magrí et al. (1997) no reporta valores de RSD para los porcentajes de recuperación; sin embargo, reporta valores de SD de 0.1-0.3 para los contenidos volumétricos de etanol lo cual significa que sus valores de RSD son inferiores a los obtenidos en este trabajo. A pesar de lo anterior, el método cumple con el criterio de precisión establecido por la Directiva 96/23/CE mencionada anteriormente.

Se puede afirmar que el método es lo suficientemente robusto como para aplicarse a muestras acuosas (soluciones estándar de etanol) y muestras complejas (tinturas de propóleo).

Tabla 21. Contenido volumétrico (%) promedio (n = 3) de alcohol de soluciones estándar de etanol y tinturas control.

Muestra	Contenido volumétrico de alcohol (%)		Recuperación (%) ± SD	RSD (%)
	Teórico	Determinado		
Estándar 1	10.00	11.65	116.55 ± 13.00	11.15
Estándar 2	40.00	38.32	95.79 ± 8.59	8.97
Estándar 3	70.00	58.49	83.56 ± 9.19	11.00
Estándar 4	80.00	60.67	75.84 ± 5.90	7.78
Estándar 5	90.00	69.33	77.04 ± 6.30	8.17
Estándar 6	100.00	94.78	86.68 ± 8.32	9.60
T40	40.00	38.03	95.08 ± 3.59	3.78
T80	80.00	69.11	86.39 ± 3.59	4.16
T100	100.00	78.65	78.65 ± 3.59	4.57

En el método propuesto por Magrí et al. (1997) para la determinación de etanol en bebidas alcohólicas, el cual es el que se empleó en este trabajo, las muestras se diluyeron hasta alcanzar una concentración de etanol de 0.1% v/v. Con el objetivo de verificar que la exactitud del método mejora cuando la concentración de etanol es cercana o igual a 0.1% v/v, se analizaron soluciones estándar de etanol (40%, 70%, 80%, 90% y 100% v/v), las cuales se diluyeron 400, 600, 800 y 1000 veces, para obtener diferentes concentraciones finales cercanas e iguales a 0.1% v/v. En la figura 26 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada una de estas concentraciones, los cuales fueron: 116-172% (solución al 40%), 71-89% (solución al 70%), 84-111% (solución al 80%), 93-106% (solución al 90%) y 90-117% (solución al 100%). Aunque en algunos casos específicos (soluciones al 40% y 70%) los porcentajes de recuperación están fuera de los criterios de aceptación (90-110%, Directiva 96/23/CE, 2002); en términos generales, se aprecia que cuando las soluciones se diluyen de tal forma que la concentración final de etanol es 0.1% v/v o cercana a ésta, los porcentajes de recuperación están más próximos al 100% lo que significa que el método tiene buena

exactitud. Por lo tanto, todas las muestras que se analizaron se diluyeron de tal forma que su concentración final fuese igual o cercana a 0.1% v/v.

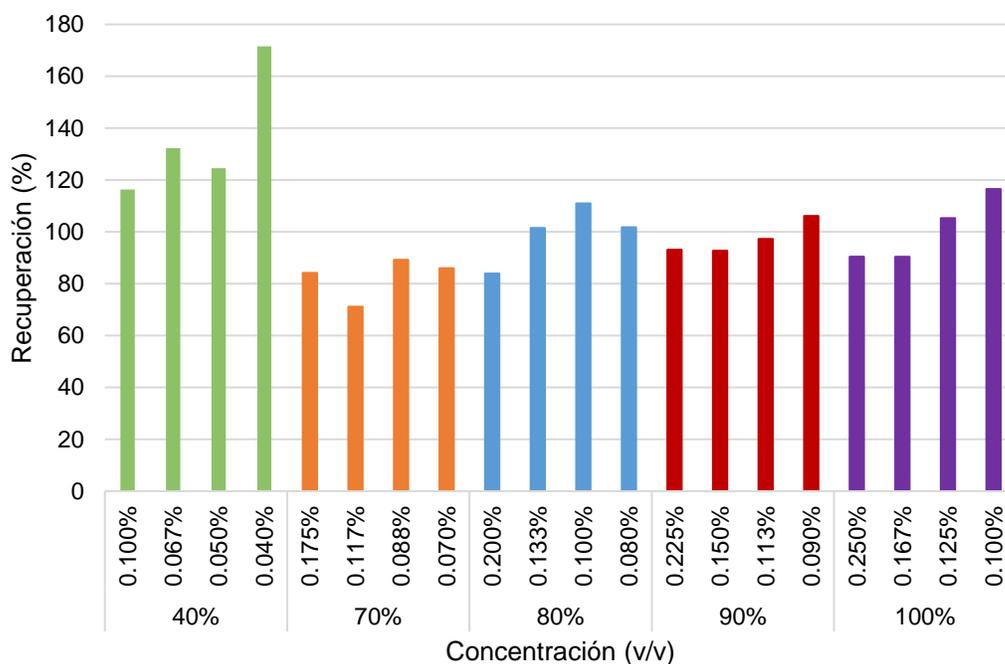


Figura 26. Porcentajes de recuperación de soluciones estándar de etanol a diferentes concentraciones.

En la figura 27 se presentan los porcentajes de recuperación de una tintura control diluida obtenidos en los días 0, 1 y 4. Únicamente en el día 0 se cumple con el criterio establecido del porcentaje de recuperación (90-110%) el cual disminuye, aproximadamente, 9% entre cada uno de los días, lo que puede deberse a volatilización del etanol durante el almacenamiento. Por lo tanto, se recomienda que las muestras sean analizadas el mismo día de su preparación.

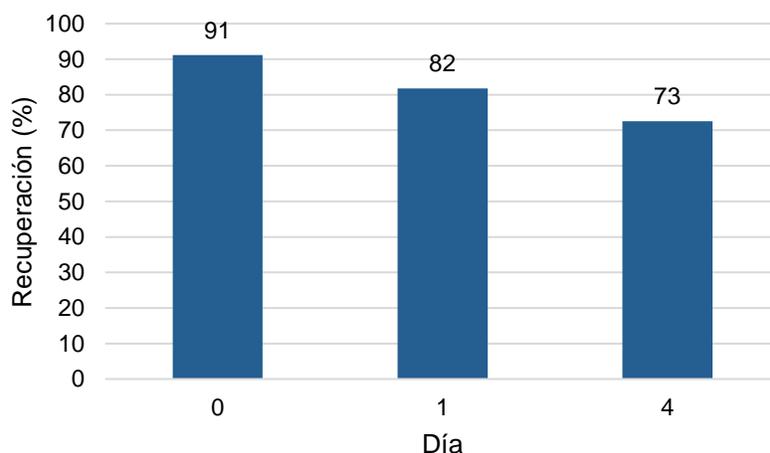


Figura 27. Porcentajes de recuperación de una tintura control en los días 0, 1 y 4.

A pesar de que la exactitud y la estabilidad del método fueron relativamente pobres, su uso se justifica por el hecho de que es rápido, selectivo, sensible, sencillo y se lleva a cabo a microescala por lo que requiere poca cantidad de muestra, lo cual representa una ventaja para su uso en el análisis de tinturas comerciales.

En la tabla 22 se muestra el contenido de etanol determinado en las tinturas comerciales con el método propuesto. El rango obtenido fue de 32.90-113.46% v/v de etanol. De las 23 tinturas analizadas, 18 tuvieron un contenido de etanol superior al 70% v/v.

Las concentraciones de etanol que se obtuvieron para las tinturas 6, 9 y 14 fueron similares al valor reportado en sus etiquetas (80%). En contraste, las tinturas 19 y 20 reportan un contenido de etanol de 0%; sin embargo, las concentraciones determinadas fueron 69.03% y 20.76%, respectivamente. Esto puede deberse a los ingredientes adicionales en la tintura; por ejemplo, la tintura 19 contiene miel de meliponinos, en la cual se ha reportado un mínimo de 50% de azúcares reductores (Vit, Medina, y Enríquez, 2004). Otra posible causa es que el contenido de etanol que se menciona en la etiqueta no sea el correcto.

En tres tinturas (12, 13 y 15) el contenido de etanol que se determinó fue superior al 100%, lo cual se atribuye a la variación intrínseca del método, por lo tanto, se consideró que la concentración de dichas tinturas fue de 100% v/v de etanol.

Finalmente, hubo poca variabilidad en la determinación de etanol en las tinturas comerciales ya que los valores de RSD fueron menores a 10% en todos los casos, con excepción de las tinturas 13, 16, 20 y 23.

Con base en estos resultados y en el análisis estadístico de las curvas de calibración que mostró que no hay diferencias significativas entre las curvas preparadas con 70%, 80% y 90% de etanol, se utilizó una curva de calibración al 80% v/v de etanol para la determinación de elementos químicos en las tinturas comerciales por MP-AES. Las tinturas cuyo contenido de etanol fue inferior al 70% también fueron analizadas en una curva de calibración al 80% v/v de etanol, ya que la mayoría de las concentraciones de etanol determinadas (20.76-69.03 % v/v) fueron cercanas a 70%.

Tabla 22. Contenido promedio de etanol (% v/v) en muestras de tintura comerciales (n = 3)

Tintura	Etanol (% v/v) ± SD	RSD (%)	Tintura	Etanol (% v/v) ± SD	RSD (%)
1	94.90 ± 0.42	0.45	13	61.41 ± 6.84	11.15
2	86.56 ± 2.60	3.00	14	87.01 ± 7.35	8.45
3	63.90 ± 4.23	6.63	15	112.04 ± 10.10	9.01
4	83.77 ± 1.86	2.22	16	32.90 ± 5.02	15.26
5	78.21 ± 5.25	6.71	17	82.84 ± 2.75	3.31
6	80.92 ± 0.72	0.89	18	99.95 ± 2.14	2.14
7	86.04 ± 3.15	3.67	19	69.03 ± 1.00	1.45
8	72.51 ± 4.46	6.15	20	20.76 ± 5.65	27.20
9	78.10 ± 4.19	5.37	21	79.61 ± 5.58	7.01
10	81.29 ± 5.32	6.55	22	87.58 ± 3.77	4.30
11	95.00 ± 0.78	0.82	23	113.46 ± 36.81	32.45
12	102.14 ± 4.44	4.35			

Determinación de metales en tinturas comerciales

En las tablas 23 y 24 se muestran las concentraciones obtenidas de los elementos en las tinturas comerciales concentradas y preparadas. Las tinturas concentradas se midieron después de centrifugar y filtrar la muestra, sin ningún tipo de dilución. Para las tinturas preparadas se tomaron 55 µL y se diluyeron en 15 mL de agua ultrapura, considerando el modo de preparación establecido en la mayoría de las tinturas.

Los elementos minoritarios que se cuantificaron en más de ocho tinturas comerciales concentradas y sus concentraciones fueron los siguientes: Al (0.05-5.42 mg·L⁻¹), Cd (0.01-0.04 mg·L⁻¹), Co (0.12-1.09 mg·L⁻¹), Cr (0.00-0.10 mg·L⁻¹), Cu (0.02-1.99 mg·L⁻¹), Mn (0.04-0.19 mg·L⁻¹), Ni (0.05-0.27 mg·L⁻¹) y Zn (0.29-8.99 mg·L⁻¹). El Ba (0.02-0.27 mg·L⁻¹) y Sr (0.04-1.54 mg·L⁻¹) se cuantificaron únicamente en dos y seis tinturas, respectivamente. El Pb estuvo por debajo del LoD en todas las tinturas. En las tinturas preparadas la concentración de todos los elementos minoritarios estuvo por debajo del límite de detección (tabla 22). Comparativamente, en la tintura control M1 se obtuvieron concentraciones relativamente similares de Al (< 0.08 mg·L⁻¹), Ba (0.06 mg·L⁻¹), Cd (0.03 mg·L⁻¹) Cr (< 0.002 mg·L⁻¹); menores para el Co (< 0.002 mg·L⁻¹), Cu (< 0.001 mg·L⁻¹) y Ni (< 0.04 mg·L⁻¹). Las concentraciones de Mn (0.24 mg·L⁻¹) y Sr (2.49 mg·L⁻¹) fueron ligeramente mayores, mientras que la del Zn fue considerablemente mayor (29.04 mg·L⁻¹). El Pb también estuvo debajo del LoD.

Por otro lado, de los cinco elementos mayoritarios; el K (5.83-280.82 mg·L⁻¹), Fe (0.05-29.59 mg·L⁻¹), Mg (0.28-36.86 mg·L⁻¹) y Na (0.83-160.39 mg·L⁻¹) se determinaron en todas las tinturas concentradas, con excepción de la tintura 17 donde el Fe estuvo por debajo del LoD. Por el contrario, el Ca (1.07-25.99 mg·L⁻¹) únicamente se cuantificó en cinco tinturas. Estas concentraciones fueron relativamente altas en comparación con las de los elementos minoritarios. En contraste, para las tinturas preparadas, las concentraciones obtenidas de los elementos mayoritarios fueron inferiores a los límites de detección y cuantificación, con excepción del K que se determinó en todas las tinturas, menos en la 14 y 16, la concentración de este elemento fue de 0.07-3.33 mg·L⁻¹. El Na se cuantificó en las tinturas 3, 5, 17, 19-21 en un rango de 0.01-0.41 mg·L⁻¹ y el Mg, en la tintura 19 con 0.10 mg·L⁻¹ (tabla 23). En la tintura control se cuantificaron todos los elementos mayoritarios, con excepción del Fe cuya concentración estuvo debajo del LoD. En la tintura control, las concentraciones del Ca (274.51 mg·L⁻¹), K (382.63 mg·L⁻¹) y Mg (430.43 mg·L⁻¹) fueron mayores que en las tinturas comerciales; en contraste, la concentración de Na (51.96 mg·L⁻¹) fue similar a lo determinado en algunas de las tinturas comerciales (2, 3, 5 y 21).

Con base en los resultados anteriores, se observa que los elementos que están presentes en la mayoría de las tinturas comerciales concentradas y en la tintura control fueron el Al, Cd, Cr, Mn, Ni, Zn, K, Mg y Na. En términos generales, las concentraciones en las tinturas comerciales y la tintura control fueron similares. Las variaciones existentes en el número de elementos y en sus concentraciones pueden atribuirse a los diversos orígenes del propóleo, el proceso de recolección y preparación y también a que varias de las tinturas comerciales contienen ingredientes adicionales como menta (*Mentha x piperita*), caléndula (*Calendula officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), balsamito (*Myroxylon balsamum*), citronela (*Cymbopogon nardus*), gordolobo (*Verbascum thapsus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), ácido ascórbico, mentol y miel.

No se cuenta con LMP de elementos químicos en las tinturas de propóleo, pero de acuerdo con la ingesta diaria recomendada por la OMS y la Unión Europea para el Al (1 mg), Ba (0.2 mg), Cd (0.7 µg), Co (100 µg), Cr (0.55 µg), Cu (0.5 mg), Mn (0.5 µg), Ni (11 µg), Pb (0.02-3.0 µg), Sr (0.13 mg), Zn (59-72 µg), Ca (700-1000 mg), Fe (9.1-19.6 mg), K (3510 mg), Mg (220-260 mg) y Na (< 2 g) se puede afirmar que las tinturas analizadas son seguras y saludables para su consumo, ya sea en forma concentrada o diluida en agua, aunque es evidente que las tinturas concentradas aportan mayor cantidad de elementos esenciales a los consumidores. Con MP-AES se pudo analizar directamente las tinturas comerciales concentradas, sin digerirlas o diluirlas previamente. Es importante destacar que actualmente no existen estudios en donde se determine la cantidad de elementos químicos en tinturas comerciales de propóleo.

Tabla 23. Concentración promedio (mg·L⁻¹) de elementos minoritarios en muestras de tinturas comerciales concentradas* (n = 3).

Tintura	Elemento									
	Al	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Sr	Zn
1	< LoD	< LoD	0.02	0.68	< LoQ	0.08	< LoD	0.10	< LoD	< LoD
2	< LoD	< LoD	0.02	0.43	0.00	1.99	< LoD	0.22	< LoD	2.83
3	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	0.01	0.02	0.15	< LoD	0.04	< LoD
4	4.28	< LoD	0.03	1.06	0.05	0.53	0.04	0.26	< LoD	0.55
5	< LoD	0.27	0.03	0.96	< LoD	1.65	0.19	0.18	1.54	0.29
6	0.17	< LoD	< LoQ	0.35	0.01	0.06	< LoD	0.09	< LoD	< LoD
7	0.12	< LoD	0.03	0.70	0.00	0.03	< LoD	0.15	< LoD	< LoD
8	0.24	< LoD	< LoQ	0.26	0.01	0.08	< LoQ	0.10	< LoD	< LoQ
9	0.08	< LoD	0.02	0.36	0.01	0.05	< LoD	0.09	< LoD	< LoD
10	0.05	< LoD	< LoQ	0.12	0.01	0.18	< LoQ	0.05	< LoD	< LoD
11	< LoD	< LoD	0.03	0.78	< LoD	0.06	< LoD	0.15	< LoD	< LoD
12	< LoD	< LoD	0.03	0.90	< LoD	1.00	< LoD	0.21	< LoD	1.09
13	5.42	< LoD	0.02	0.53	0.06	0.37	0.16	0.17	< LoD	1.84

Tabla 23 (cont.). Concentración promedio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de elementos minoritarios en muestras de tinturas comerciales concentradas* (n = 3).

Tintura	Elemento									
	Al	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Sr	Zn
14	2.95	< LoD	0.04	1.04	0.04	0.29	0.14	0.26	< LoD	0.81
15	< LoD	< LoD	0.03	0.83	< LoD	0.04	< LoD	0.18	< LoD	< LoD
16	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	0.02	< LoD	< LoQ	< LoD	0.04	< LoD
17	< LoD	< LoD	0.01	0.19	0.00	0.05	0.07	0.07	< LoD	< LoD
18	< LoD	< LoD	0.02	0.68	0.01	0.25	< LoQ	0.16	< LoD	< LoD
19	0.18	0.02	< LoD	< LoD	0.02	0.17	0.19	< LoD	0.09	0.60
20	0.17	< LoQ	< LoD	< LoD	0.02	0.07	0.06	< LoD	0.04	< LoD
21	0.11	< LoD	< LoQ	< LoQ	0.01	0.05	< LoD	0.05	0.10	< LoD
22	2.36	< LoD	0.03	1.04	0.10	0.52	< LoD	0.27	< LoD	1.16
23	1.23	< LoD	0.03	1.09	0.01	0.15	< LoD	0.26	< LoD	8.99
Promedio	1.34	0.15	0.03	0.67	0.02	0.35	0.13	0.16	0.31	2.02
Mediana	0.18	0.15	0.03	0.69	0.01	0.12	0.15	0.16	0.07	1.09
Mínimo	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
Máximo	5.42	0.27	0.04	1.09	0.10	1.99	0.19	0.27	1.54	8.99

*tintura concentrada (tintura centrifugada y filtrada, sin diluir).

LoD: límite de detección.

LoQ: límite de cuantificación.

Tabla 24. Concentración promedio (mg·L⁻¹) de elementos mayoritarios en muestras de tinturas comerciales (n = 3).

Tintura		Elemento				
		Ca	Fe	K	Mg	Na
1	C	< LoD	1.85	11.79	4.62	0.83
	P	< LoD	< LoD	0.15	< LoD	< LoD
2	C	< LoD	1.04	280.82	1.06	31.65
	P	< LoD	< LoD	1.78	< LoD	< LoD
3	C	25.99	0.78	48.84	36.86	45.27
	P	< LoD	< LoD	0.30	< LoD	0.02
4	C	< LoD	29.59	79.24	8.30	6.83
	P	< LoD	< LoD	0.81	< LoD	< LoD
5	C	4.40	1.44	56.90	15.54	43.60
	P	< LoD	< LoD	0.54	< LoD	0.03
6	C	< LoD	1.99	39.27	5.68	1.85
	P	< LoD	< LoD	0.24	< LoD	< LoD
7	C	< LoD	2.24	27.77	3.47	1.22
	P	< LoD	< LoD	0.11	< LoD	< LoD
8	C	< LoD	1.56	52.52	9.14	4.82
	P	< LoD	< LoD	0.36	< LoD	< LoD
9	C	< LoD	1.48	38.08	6.05	1.98
	P	< LoD	< LoD	0.16	< LoD	< LoD
10	C	< LoD	1.23	40.86	7.90	2.37
	P	< LoD	< LoD	0.28	< LoD	< LoD
11	C	< LoD	1.86	24.11	5.55	< LoD
	P	< LoD	< LoD	0.07	< LoD	< LoD
12	C	< LoD	1.24	86.17	1.40	14.46
	P	< LoD	< LoD	1.04	< LoD	< LoD
13	C	< LoD	1.78	28.80	4.23	0.90
	P	< LoD	< LoD	0.29	< LoD	< LoD
	P	< LoD	< LoD	3.33	0.10	0.41

Tabla 24 (cont.). Concentración promedio (mg·L⁻¹) de elementos mayoritarios en muestras de tinturas comerciales (n = 3).

Tintura		Elemento				
		Ca	Fe	K	Mg	Na
14	C	< LoD	17.00	66.30	16.61	4.40
	P	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
15	C	< LoD	2.00	21.16	0.56	5.44
	P	< LoD	< LoD	0.70	< LoD	< LoD
16	C	1.44	0.28	5.83	9.90	29.80
	P	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
17	C	< LoD	< LoD	38.01	6.73	155.70
	P	< LoD	< LoD	0.14	< LoD	0.25
18	C	< LoD	1.93	83.80	6.23	2.04
	P	< LoD	< LoD	1.56	< LoD	< LoD
19	C	< LoQ	0.05	91.04	13.20	84.57
	P	< LoD	< LoD	3.33	0.10	0.41
20	C	1.07	2.18	43.78	8.67	160.39
	P	< LoD	< LoD	0.33	< LoD	0.30
21	C	2.36	0.80	45.61	12.08	35.49
	P	0.89	< LoD	0.25	< LoD	0.01
22	C	< LoD	27.72	81.71	0.28	111.63
	P	< LoQ	< LoD	0.81	< LoD	0.17
23	C	< LoD	6.42	49.22	11.06	3.10
	P	< LoQ	< LoD	0.31	< LoD	< LoD
Promedio	C	7.05	4.84	58.33	8.48	34.01
	P	0.89	NA	0.65	0.10	0.28
Mediana	C	2.36	1.82	45.61	6.73	6.13
	P	0.89	NA	0.31	0.10	0.28
Mínimo	C	< LoD	< LoD	5.83	0.28	< LoD
	P	< LoD	NA	< LoD	< LoD	< LoD
Máximo	C	25.99	29.59	280.82	36.86	160.39
	P	0.89	NA	3.33	0.10	0.50

C: tintura concentrada (tintura centrifugada y filtrada, sin diluir).

P: tintura preparada (55 µL de tintura diluidos en 15 mL de agua ultrapura).

LoD: límite de detección.

LoQ: límite de cuantificación.

NA: no aplica.

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones instrumentales para identificar y cuantificar elementos en propóleo crudo, tinturas y residuos sólidos de extracción por MP-AES.

Se validó el método de determinación de elementos por MP-AES en propóleo crudo y tinturas de propóleo. El método resultó ser selectivo, sensible, preciso y con un amplio rango lineal, aunque no fue lo suficientemente exacto. Se obtuvieron mejores límites de detección que con FAAS para Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na y Zn y mejores que con ICP-AES para K y Na.

Se obtuvieron mejores recuperaciones en las tinturas fortificadas que en las tinturas preparadas a partir de propóleo fortificado: la transferencia de los elementos a las tinturas fue pobre.

Se determinó la cantidad de elementos en cuatro muestras de propóleo crudo, una tintura control y el residuo sólido de extracción. El orden de abundancia de los elementos en el propóleo crudo y en el residuo fue $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{K} > \text{Zn} > \text{Na} > \text{Al} > \text{Fe} > \text{Sr} > \text{Ba}$; en la tintura, $\text{K} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Na} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Mn} > \text{Ba} > \text{Cd}$. Los demás elementos estuvieron debajo de sus límites de detección o cuantificación.

Se determinó la cantidad de elementos en 23 tinturas comerciales de propóleo tanto concentradas como diluidas en agua (55 μL en 15 mL de agua ultrapura). En las muestras concentradas el orden de abundancia fue $\text{K} > \text{Na} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Fe} \gg \text{Zn} > \text{Al} > \text{Co}, \text{Cu}, \text{Sr}, \text{Ni}, \text{Ba}, \text{Mn}, \text{Cr}, \text{Cd}$. La concentración de los elementos restantes estuvo debajo del LoD. En las muestras diluidas todos los elementos, excepto el K, estuvieron debajo del LoD. Todos los elementos presentes en la tintura control se detectaron en las tinturas comerciales.

Las concentraciones de los elementos en el propóleo crudo y en las tinturas no superaron los LMP ni los niveles de ingesta diaria recomendada por la OMS. Por lo tanto, el consumo moderado del propóleo y de las tinturas no representa un peligro para la salud y puede considerarse saludable.

Se estudió el efecto de la concentración de etanol en las pendientes de la curva de calibración. Hubo un aumento de la señal cuando la concentración de etanol aumentó. Los LoD y los LoQ tendieron a disminuir cuando hay un aumento de etanol; sin embargo, este efecto se invirtió cuando la concentración de etanol fue de 100%.

Se estudió estadísticamente el efecto de la concentración de etanol en la pendiente y en el intercepto de las curvas de calibración. El análisis mostró que no hay

diferencia estadísticamente significativa entre las curvas preparadas con 70%, 80%, y 90% v/v de etanol. La mayoría de las curvas de calibración contuvieron al cero.

Se validó el método para determinar la cantidad de etanol en las tinturas control y se determinó el contenido de etanol en tinturas comerciales de propóleo, el cual fue de 20.76-113.46% v/v de etanol, con un promedio de 80.40% v/v de etanol.

REFERENCIAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2004). *Public Health Statement. Strontium*. Springfield.
- Agilent Technologies, Inc. (29 de Noviembre de 2016). *Agilent | Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics*. Obtenido de RAFA_seminar2_AD.pdf: http://www.agilent.com/cs/library/sales/public/RAFA_seminar2_AD.pdf
- Aksoy, C., Atabay, M. M., Tirasoglu, E., Koparan, E. T., & Kekillioglu, A. (2017). Elemental content profiles in propolis from several cities of Turkey. *Functional Foods in Health and Disease*, 7(8), 661-670.
- Alić, B., Begić, N., Spiljak, L., Velagić-Habul, E., Sarić, E., & Ramić, D. (2016). The content of macro and microelements in propolis collected from three geographic areas in Bosnia and Herzegovina. *Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo*.
- Amais, R. S., Garcia, E. E., Monteiro, M. R., Nogueira, A. R., & Nóbrega, J. A. (2010). Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma. *Microchemical Journal*, 96(1), 146-150.
- Andrade, M. G., Barbosa, M. A., Pereira, J. T., Andrade, E., Pires, A., Caldas, J. C., . . . Araújo, J. (2013). Evaluation of sample preparation procedures for trace element determination in Brazilian propolis by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and their discrimination according to geographic region. *Food Analytical Methods*, 6(3), 872-880.
- Baas Dzul, L. V. (2012). Determinación de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras de propóleos del Estado de Yucatán por polarografía de redisolución anódica. *Tesis de licenciatura*. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Bankova, V., Christov, R., & Delgado, A. (1998). Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. *Phytochemistry*, 49(5), 1411-1415.
- Bankova, V., De Castro, S., & Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Banskota, A., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytoteraphy Research*, 15(7), 561-571.
- Bogdanov Popov, B., K. H., Presilski, S., Shariati, A., & Najman, S. (2017). Assesment of heavy metals in propolis and soil from the Pelagonia region, Republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 36(1).
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.

- Bogdanov, S., & Bankova, V. (2012). The propolis book. *Bee hexagon*.
- Bolio Gahona, M. P. (2013). Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de Hg y As en propóleos. *Tesis de licenciatura*. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Bonheví, J., & Coll, F. (2000). Study on propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 778-784.
- Bonvehí, J., & Bermejo, F. (2013). Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(7), 6035-6047.
- Boorn, A. W., & Browner, R. F. (1982). Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 54(8), 1402-1410.
- Borges-Gómez, L., Escamilla-Bencomo, A., Soria-Fregoso, M., & Casanova-Villareal, V. (2005). Potasio en suelos de Yucatán. *Terra Latinoamericana*, 23(4), 437-445.
- Bulska, E., & Tschopel, P. (1993). Different sample introduction systems for the simultaneous determination of As, Sb and Se by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 271, 171-181.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Buriol, L., Finger, D., Schmidt, E., Santos, J., Rosa, M., Quináia, S., . . . Moraes, M. (2009). Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*, 32(2), 296-302.
- Campbell, A. (2002). The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology dialysis transplantation*, 17(2), 17-20.
- Cantarelli, M. A., Camiña, J. M., Pettenatic, E. M., Marchevskya, E. J., & Pellerano, R. G. (2011). Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 256-260.
- Carrión Samaniego, X. M. (2009). Análisis de la concentración de As en tres alimentos (papas (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), y leche cruda) producidas en las zonas afectadas por el volcán Tungurahua (Guanopepipe). *Tesis de doctorado*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(S1), S1-S6.
- Castro, M. (2006). Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud. *Memoria de licenciatura*. Ciudad de México, México: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente.

- Choi, Y., Noh, D., Cho, S., Suh, H., Kim, K., & Kim, J. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 20(6), 531-536.
- Conti, M. E., & Botrè, F. (2001). Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69(3), 267-282.
- Cvek, J., Medic-Saric, M., Jasprica, I., Zubcic, S., Vitali, D., Mornar, A., & Vedrina-Dragojevic, I. (2007). Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, 18(5), 451-459.
- Cvek, J., Medić-Šarić, M., Vitali, D., Vedrina-Dragojević, I., Šmit, Z., & Tomić, S. (2008). The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of Apicultural Research*, 47(1), 35-45.
- Di Bartolomeo, B., Cilurzob, F., Cristianob, M. C., Cifelli, R., & Locatelli, M. (s.f.). Recent procedures for organic and inorganic toxics extraction in Honey, Propolis, and Royal Jelly: a review. *Advances in Food Safety and Health*, 51.
- Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. (2002). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.
- Dogan, M., Silici, S., Saraymen, R., & Ilhan, I. (2006). Element content of propolis from different regions of Turkey. *Acta Alimentaria*, 5(1), 127-130.
- Donati, G. L., Amais, R. S., Schiavo, D., & Nobrega, J. A. (2013). Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28(5), 755-759.
- Eremia, N., & Dabija, T. (2007). The content of micro- and macroelements in propolis. *Bulletin of UASVM Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 64(1-2).
- Eurachem working group. (1998). The fitness of porpouse of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.
- FAWHO Expert Committe on Food Aditives. (2007). *Nickel in drinking-water*.
- Falcó, G., Llobet, J. M., Zareba, S., Krzysiak, K., & Domingo, J. L. (2005). Risk assessment of trace elements intake through natural remedies in Poland. *Trace Elements and Electrolytes*, 22(3), 222-226.
- FAO/WHO. (2001). *Human vitamin and mineral requirements*. Roma.
- FAO/WHO. (2007). *Evaluation of certain food aditives and contaminants: sixty-seventh report of the joint FAO/WHO expert comittee on food aditives: technical report series, no. 940*. Geneva: World Health Organization.

FAO/WHO. (25 de Septiembre de 2016). The 53rd Meeting of the Joint Expert Committee on food additives. Obtenido de <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm>

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2007). *Evaluation of certain food additives and contaminants: Sixty-seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Roma.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2011). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Ginebra.

Finger, D., Kelte, I., Reyes, Y., & Pércio, S. (2014). Propolis as an Indicator of Environmental Contamination by Metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(3), 259-264.

Formicki, G., Greń, A., Stawarz, R., Zyśk, B., & Gał, A. (2013). Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(1), 99-106.

Fosmire, G. J. (1990). Zinc toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(2), 225-227.

Gong, S., Luo, L., Gong, W., Gao, Y., & Xie, M. (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chemistry*, 134(1), 583-588.

González-Martín, M. I., Escuredo, O., Revilla, I., M., V.-Q. A., Coello, M. C., Palacios Riocerezo, C., & 4 Wells Moncada, G. (2015). Determination of the mineral composition and toxic element contents of propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors*, 15(11), 27854-27868.

Grembecka, M., & Szefer, P. (2013). Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 4033-4047.

Hu, Z., Hub, S., Gao, S., Liu, Y., & Lin, S. (2004). Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. *Spectrochimica Acta Part B*, 59, 1463-1470.

Huheey, J. E., Keiter, E. A., & Keiter, R. L. (1997). *Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad*. México, D.F.: Oxford University Press.

International Food Information Service. (2005). *IFIS dictionary of food science and technology*. Shinfield, FL.: Blackwell Publishing.

International Programme on Chemical Safety & Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. (2010). *Strontium and strontium compounds*. Ginebra: World Health Organization.

Kalbande, D., Dhase, S., Chaudhari, P., & Wate, S. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen urban. *Environmental Monitoring and Assessment*, 138, 233-238.

- Kampf, C., Filippi, A., Zuth, C., Hoffmann, T., & Opatz, T. (2016). Secondary brown carbon formation via the dicarbonyl imine pathway: nitrogen heterocycle formation and synergistic effects. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *18*(27), 18353-18364.
- Karlsson, S., Sjöberg, V., & Ogar, A. (2015). Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). *Talanta*, *135*(1), 124-132.
- Król, W., Bankova, V., Sforcin, J. M., & Szliszka, E. (2013). Propolis: properties, application, and its potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, *64*(3), 235-240.
- Kulevanova, S., Stafilov, T., & Dorevski, K. (1995). Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry. *Acta Pharmaceutica*, *45*(1), 45-52.
- Kulikov, E. (2015). Determination of major elements in methanol using the Agilent 4200 MP-AES with External Gas Control Module. *Agilent Technologies, Inc.*
- Li, W., Simmons, P., Shrader, D., Herrmann, T., & Dai, S. (2013). Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta*, *112*(15), 43-48.
- Liben, T., Atlabachew, M., & Abebe, A. (2018). Total phenolic, flavonoids and some selected metal content in honey and propolis samples from South Wolo zone, Amhara region, Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture*, *4*.
- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabiani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., . . . Feresin, G. E. (2009). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 2691-2698.
- López Domínguez, C. M. (2012). Determinación de metales pesados en muestras de propóleo por espectrometría de plasma acoplado inductivamente con detector de masas. *Tesis de licenciatura*. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Madras-Majewska, B., & Jasinski, Z. (2003). Lead content of bees, brood and bee products from different regions of Poland. *Journal of Apicultural Science*, *47*(2), 47-55.
- Maeda, T., & Wagatsuma, K. (2005). Direct loading of ethanol solution into high-power nitrogen–oxygen mixed gas microwave-induced plasma and the emission characteristics. *Spectrochimica Acta Part B*, *60*, 81-87.
- Magrí, A., Magrí, A., Balestrieri, F., Sacchini, A., & Marini, D. (1997). Spectrophotometric micro-method for the determination of ethanol in commercial beverages. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, *357*(7), 985-988.

- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. México, D.F.: Reverté Ediciones.
- Maras, A. M., Sezhin, O., Taspinar, M., & Yuksek, V. (2017). Elementary analysis and anti-tumor activity on glioblastoma cell lines of propolis samples from Giresun province of Turkey. *Journal of US-China Medical Science*, *14*, 157-163.
- Marcucci, M., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., Castro, D., . . . Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(2), 105-112.
- Martin, G., Kargar, N., & Buyukisik, H. B. (2016). Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*, *90*, 331-335.
- Memarian, H., Bagheri, M., & Döpp, D. (2004). Synthesis and Photochemistry of Novel 3,5-Diacetyl-1,4-dihydropyridines. II. *Monatshefte für Chemie*, *135*, 833-838.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., & Amanzadeh, Y. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, *103*(3), 729-733.
- Montgomery, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. (2006). *Introduction to Linear Regression Analysis* (Cuarta ed.). New Jersey, USA: Wiley & Sons.
- Morgado Schmidt, E., Stock, D., Garcia Chada, F. J., Finger, D., Frankland Sawaya, A. C., Nogueira Eberlin, M., . . . Reyes Torres, Y. (2014). A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed Research International*.
- Morgano, M. A., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 6876-6883.
- Nash, T. (1953). The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction. *Biochemical Journal*, *55*(3), 416.
- Nelson, J., Gilleland, G., Poirier, L., Leong, D., Hajdu, P., & Lopez-Linares, F. (2015). Elemental analysis of crude oils using microwave plasma atomic emission spectroscopy. *Energy & fuels*, *29*(9), 5587-5594.
- Nelson, J., H. H., Gilleland, G., Cuthbertson, D., Boulton, R., & Ebeler, S. (2015). Elemental profiling of Malbec wines made under controlled conditions by microwave plasma atomic emission spectroscopy. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*, 373-378.
- Nham, T., & Taylor, C. (2015). Cost-effective analysis of major, minor, and trace elements in foodstuffs using the 4100 MP-AES. *Agilent Technologies, Inc.*
- Ohata, M., Ota, H., Fushimi, M., & Furuta, N. (2000). Effect of adding oxygen gas to a high power nitrogen microwave-induced plasma for atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, *55*, 1555-1564.

- Ozbek, N., & Akman, S. (2016). Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectroscopy. *Food Chemistry*, 200, 245-248.
- Ozbek, N., & Akman, S. (2016). Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. *Food Chemistry*, 192(1), 295-298.
- Park, Y. K., & Ikegaki, M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(11), 2230-2232.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M., & Tarasco, R. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: Honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 140(2), 170-176.
- Pierini, G. D., Granero, A. M., Di Nezio, M. S., & Centurión, M. E. (2013). Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentinian raw propolis based on bismuth electrodes. *Microchemical journal*, 106, 102-106.
- Qiu, P., Ai, C., Lin, L., Wu, J., & Ye, F. (2007). Simultaneous determination of selenium and arsenic contents in different extracts of Radix Astragali by enhancement effect of ethanol in hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Microchemical journal*, 87, 1-5.
- Roman, A., & Popiela-Pleban, E. (2012). Contamination of propolis used as a dietary supplement. *Potravinarstvo*, 6(2), 50-52.
- Roman, A., Madras-Majewska, B., & Popiela-Pleban, E. (2011). Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science*, 55(2), 97-106.
- Roman, A., Popiela, E., & Dobrzanski, Z. (2011). The propolis as a bioindicator of environmental heavy metals pollution. *Proceedings of the XV International Congress of the International Society for Animal Hygiene*, (págs. 1151-1153). Viena.
- Saint'Pierre, T. D., Tormen, L., Frescura, V. L., & Curtius, A. J. (2006). The direct analysis of fuel ethanol by ICP-MS using a flow injection system coupled to an ultrasonic nebulizer for sample introduction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 1340-1344.
- Sales, A., Alvarez, A., Rodriguez Areal, M., Maldonado, L., Marchisio, P., Rodríguez, M., & Bedascarrasbure, E. (2006). The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1352-1356.
- San Román Ávila, D. A. (2012). Aplicación de biosensores electroquímicos para la determinación de Pb²⁺ y Cd²⁺ en muestras de propóleos. *Tesis de licenciatura*. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.

- Santana, E., Almeida, A., Jabor, A., Almeida, A., & Chung, M. (2008). Determination of calcium and magnesium in hydroethanolic extracts of propolis by atomic absorption flame spectrometry. *Journal of basic and applied pharmaceutical sciences*, 29(1), 77-80.
- Santiago Rivas, S. (2007). Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón. *Tesis de doctorado*. Santiago de Compostela, Galicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Sattler, J. A., De-Melo, A. A., Nascimento, K. S., Melo, I. L., Mancini-Filho, J., Sattler, A., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Essential minerals and inorganic contaminants (barium, cadmium, lithium, lead and vanadium) in dried bee pollen produced in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Food Science and Technology*, 36(3), 505-509.
- Scheller, S., Czauderna, M., Krol, W., Konecki, J., Czuba, Z., Gabrys, J., . . . Shani, J. (1989). Trace elements in Propolis and in its Ethanolic Extract (EEP) as determined by Neutron Activation Analysis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(1-2), 170-172.
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks. (2012). *Assessment of the Tolerable Daily Intake of barium*. Bruselas.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (6 de Octubre de 2017). Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAGGAN-2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaría de Salud. (9 de Julio de 1997). Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. *Diario Oficial de la Federación*.
- Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D., & Fearnley, J. (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytoteraphy Research*, 22(9), 1256-1263.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.
- Sundquist, J., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1991). Vacuum fermentation. En B. Mattiasson, & O. Holst, *Extractive bioconversions* (pág. 237). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Sungur, S., & Gülmez, F. (2015). Determination of metal contents of various fibers used in textile industry by MP-AES. *Journal of Spectroscopy*, 2015.
- Suwan, R., Jayachandran, K., Tran Nguyen, N., Boulenouar, A., Fujita, K., & Saneoka, H. (2008). Barium toxicity effects in soybean plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 397-403.

- Tanabe, C. K., Hopfer, H., Gilleland, G., Liba, A., Ebeler, S. E., & Nelson, J. (2016). Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation –microwave plasma– atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(6), 1223-1227.
- Tanabe, C., Silva, F., Gilleland, G., & Nelson, J. (2015). Determination of major elements in milk using the Agilent 4200 MP-AES. *Agilent Technologies, Inc.*
- Thomas, R. (2014). Emerging technology trends in Atomic Spectroscopy are solving real-world application problems. *Spectroscopy*, 29(3), 42-53.
- Tosi, E. A., Re, E., Ortega, M. E., & Cazzoli, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104(3), 1025-1029.
- Tosic, S., Stojanovic, G., Mitic, S., Pavlovic, A., & Alajic, S. (2017). Mineral composition of selected Serbian propolis samples. *Journal of Apicultural Science*, 61(1), 5-15.
- Truong, P., & Cauduro, J. (2014). Determination of major elements in fruit juices using the Agilent 4200 MP-AES with the Agilent 4107 Nitrogen Generator. *Agilent Technologies, Inc.*
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(13).
- Tuzen, M., Sari, H., & Soylak, M. (2004). Microwave and wet digestion procedures for Atomic Absorption Spectrometric determination of trace metals contents of sediment samples. *Analytical Letters*, 37(9), 1925-1936.
- Vummiti, D. (2015). Total metals analysis of digested plant tissue using an Agilent 4200 Microwave Plasma-AES. *Agilent Technologies, Inc.*
- WHO. (2012). *Guideline: potassium intake for adults and children*. Ginebra: World Health Organization.
- WHO. (2012). *Guideline: sodium intake for adults and children*. Ginebra: World Health Organization.
- Wilson, S., & Horne, D. (1983). Evaluation of ascorbic acid in protecting labile folic derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 6500-6504.
- Young-Jin, K. (2015). Determination of trace elements in isopropyl alcohol using an Agilent 4200 MP-AES with External Gas Control Module. *Agilent Technologies, Inc.*
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (Quinta ed.). New Jersey, USA: Prentice-Hall.
- Zhao, Y., Zenghe, L., Ross, A., Huang, Z., Chang, W., Ou-yang, K., . . . Wu, C. (2015). Determination of heavy metals in leather and fur by microwave plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 112, 6-9.

ANEXOS

Comparación de curvas de calibración

Metodología (análisis estadísticos)

Para cada elemento se utilizó la prueba global de coincidencia de rectas de regresión (Zar, 2010), en la comparación de las 6 curvas de calibración obtenidas al utilizar diferentes concentraciones de etanol (0%, 10%, 70%, 80%, 90% y 100% v/v).

Modelo y descripción de las variables de la curva de calibración para el k-ésimo elemento:

$$Y_k = \alpha_k + \beta_k X_k + \varepsilon_k \quad (\text{k-ésimo modelo de regresión lineal simple})$$

donde:

X_k : concentración del k-ésimo elemento.

Y_k : intensidad de la emisión de luz con el k-ésimo elemento.

ε_k : error aleatorio del k-ésimo modelo.

A continuación, se describe brevemente el procedimiento:

1. Prueba global de coincidencia. ($H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k$ y $\alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_k$).

Si la prueba no resultó significativa (no se rechazó H_0) entonces las k rectas de calibración son coincidentes.

2. Cuando la prueba global de coincidencia resultó significativa, se realizaron comparaciones para determinar si las diferencias entre las curvas de calibración fueron debidas a diferencias entre pendientes o entre interceptos.

- a. Prueba de igualdad de pendientes. ($H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k$)

Si la prueba resultó significativa (se rechaza H_0) entonces las k rectas de calibración difieren en sus pendientes, y se realizaron comparaciones múltiples con base en el método de Tukey (Zar, 2010) para determinar las curvas de calibración que difirieron en sus pendientes; es decir, $H_0: \beta_A = \beta_B$ vs $H_1: \beta_A \neq \beta_B$, donde A y B representan dos de las k curvas de calibración.

- b. En los casos en que la prueba de igualdad de pendientes no resultó significativa, se realizó la prueba de igualdad de interceptos ($H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_k$),

y las comparaciones múltiples (Zar, 2010) correspondientes para determinar las curvas de calibración que difieren en sus interceptos; es decir, $H_0: \alpha_A = \alpha_B$ vs $H_1: \alpha_A \neq \alpha_B$, donde A y B representan dos de las k curvas de calibración. Así, se obtuvieron rectas con una pendiente común, pero interceptos diferentes.

Adicionalmente se calcularon intervalos de confianza (IC) del 95% para los interceptos (Montgomery, Peck, y Vining, 2006) de las curvas de calibración para determinar si difirieron significativamente de cero.

Resultados por elemento

Aluminio (Al)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 48.74$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 54.77$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples sólo dos pares de pendientes resultaron iguales: $\beta_{100} = \beta_{90}$ y $\beta_{80} = \beta_{70}$. Respecto a los interceptos, cada uno de los IC del 95% contiene al cero, por lo que los seis interceptos no difirieron significativamente de cero (tabla 25).

Tabla 25. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Al.

Etanol (% v/v)	R ²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	99.26%	53738.8 a	3878.12	$-2338.07 \leq \alpha_{100\%} \leq 10094.30$
90	99.09%	52693.3 a	-980.279	$-7721.36 \leq \alpha_{90\%} \leq 5760.80$
80	98.95%	46044.0 b	-785.299	$-7113.29 \leq \alpha_{80\%} \leq 5542.70$
70	99.87%	44260.0 b	1021.57	$-1150.61 \leq \alpha_{70\%} \leq 3193.75$
10	99.94%	34536.2 c	568.915	$-594.17 \leq \alpha_{10\%} \leq 1732.0$
0	99.98%	26749.1 d	51.5902	$-485.66 \leq \alpha_{0\%} \leq 588.84$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Arsénico (As)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 18.0358$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 31.0027$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90}$, $\beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{100}$ y $\beta_0 = \beta_{10}$. Respecto a los seis interceptos, sólo el IC del 95% para 90% de etanol contiene al cero, por lo que los otros cinco interceptos difirieron significativamente de cero (tabla 26).

Tabla 26. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Ni.

Etanol (% v/v)	R ²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
100	92.11%	4954.80 a	-2871.16	- 4809.42 ≤ α _{100%} ≤ -932.91
90	98.92%	3964.17 ab	-386.69	- 941.22 ≤ α _{90%} ≤ 167.84
70	98.49%	3190.78 b	-554.95	- 1083.34 ≤ α _{70%} ≤ -26.57
80	98.44%	2980.91 b	-721.06	- 1223.01 ≤ α _{80%} ≤ -219.17
0	95.13%	1211.89 c	509.26	142.77 ≤ α _{0%} ≤ 875.75
10	96.35%	1083.07 c	400.57	119.05 ≤ α _{10%} ≤ 682.08

*Pendientes con distinta letra difieren (P < 0.05), prueba de Tukey.

Bario (Ba)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 14.2255$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 13.6619$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{70}$, $\beta_{70} = \beta_0$ y $\beta_0 = \beta_{10}$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 27).

Tabla 27. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Ba.

Etanol (% v/v)	R ²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
100	97.66%	621305.33 a	95925.56	- 32672.0 ≤ α _{100%} ≤ 224523.0
90	98.17%	592055.52 a	9334.40	- 98751.8 ≤ α _{90%} ≤ 117421.0
80	97.83%	551989.57 a	13220.89	- 96546.8 ≤ α _{80%} ≤ 122989.0
70	99.29%	509231.56 a b	34331.55	- 23111.6 ≤ α _{70%} ≤ 91774.7
0	99.88%	397462.52 b c	11339.73	- 6767.4 ≤ α _{0%} ≤ 29446.9
10	99.73%	392137.61 c	16432.81	- 10883.1 ≤ α _{10%} ≤ 43748.7

*Pendientes con distinta letra difieren (P < 0.05), prueba de Tukey.

Cadmio (Cd)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 19.8229$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 21.3530$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron cuatro grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{90} = \beta_{100} = \beta_{80}$, $\beta_{100} = \beta_{80} = \beta_{70}$, $\beta_{70} = \beta_0$ y $\beta_0 = \beta_{10}$. Respecto a los seis interceptos, todos

los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 28).

Tabla 28. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Cd.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
90	98.27%	31944.95 a	344.08	$-5319.52 \leq \alpha_{90\%} \leq 6007.68$
100	98.79%	30259.11 a b	3439.12	$-1041.22 \leq \alpha_{100\%} \leq 7919.46$
80	98.17%	28057.76 a b	284.25	$-4837.89 \leq \alpha_{80\%} \leq 5406.38$
70	99.38%	26055.43 b c	1522.21	$-1236.16 \leq \alpha_{70\%} \leq 4280.58$
0	99.94%	21429.55 c d	343.40	$-348.51 \leq \alpha_{0\%} \leq 1035.31$
10	99.81%	17826.66 d	584.58	$-445.33 \leq \alpha_{10\%} \leq 1614.49$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Calcio (Ca)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 56.0741$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 59.9812$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{10}$, y β_0 . Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 29).

Tabla 29. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Ca.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
100	97.85%	1276.13 a	1673.88	$-852.64 \leq \alpha_{100\%} \leq 4200.40$
90	99.33%	1205.23 a	1172.62	$-148.15 \leq \alpha_{90\%} \leq 2493.40$
80	99.89%	1185.74 a	494.38	$-41.27 \leq \alpha_{80\%} \leq 1030.02$
70	99.56%	1141.60 a	492.18	$-522.85 \leq \alpha_{70\%} \leq 1507.21$
10	99.51%	846.03 b	525.14	$-270.47 \leq \alpha_{10\%} \leq 1320.74$
0	99.74%	468.78 c	232.42	$-87.77 \leq \alpha_{0\%} \leq 552.60$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Cobalto (Co)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 8.0856$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 6.6741$, $P = 0.0002$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{70} = \beta_{90}$

= $\beta_{80} = \beta_{10}$, $\beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{10}$ y $\beta_{80} = \beta_{10} = \beta_0 = \beta_{100}$. Respecto a los seis interceptos, el IC del 95% para 100% de etanol no contiene al cero, por lo que el intercepto de esta curva de calibración difirió de cero; como ambos límites de confianza son positivos dicho intercepto resultó significativamente mayor que cero (tabla 30).

Tabla 30. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Co.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
70	99.84%	12638.72 a	486.34	$-199.90 \leq \alpha_{70\%} \leq 1172.57$
90	99.37%	11661.61 a b	-91.41	$-1332.31 \leq \alpha_{90\%} \leq 1149.49$
80	98.65%	10291.29 a b c	231.61	$-1379.47 \leq \alpha_{80\%} \leq 1842.69$
10	99.93%	9623.11 a b c	252.47	$-93.36 \leq \alpha_{10\%} \leq 598.30$
0	99.96%	7966.24 c	112.30	$-114.27 \leq \alpha_{0\%} \leq 338.88$
100	74.94%	7542.02 c	7564.27	$1735.66 \leq \alpha_{100\%} \leq 13392.90$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Cromo (Cr)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 68.7036$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 81.5672$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvo un grupo homogéneo de pendientes: $\beta_{90} = \beta_{100} = \beta_{80} = \beta_{70}$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 31).

Tabla 31. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Cr.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
90	99.24%	66429.52 a	-1873.64	$-9655.68 \leq \alpha_{90\%} \leq 5908.40$
100	99.80%	65731.70 a	2841.70	$-1133.20 \leq \alpha_{100\%} \leq 6816.61$
80	99.00%	61864.11 a	-1287.40	$-9594.20 \leq \alpha_{80\%} \leq 7019.40$
70	99.87%	60578.33 a	1322.90	$-1590.30 \leq \alpha_{70\%} \leq 4236.10$
10	99.90%	44082.83 b	991.53	$-927.07 \leq \alpha_{10\%} \leq 2910.12$
0	99.99%	31381.96 c	135.46	$-365.87 \leq \alpha_{0\%} \leq 636.79$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Cobre (Cu)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 27.9634$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de

igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 31.7013$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron dos grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90} = \beta_{70} = \beta_{80}$ y $\beta_{10} = \beta_0$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 32).

Tabla 32. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Cu.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	99.41%	184768.29 a	12257.94	$-6736.91 \leq \alpha_{100\%} \leq 31252.80$
90	98.98%	181598.78 a	-3718.22	$-28361.0 \leq \alpha_{90\%} \leq 20924.50$
70	99.79%	173400.98 a	5469.34	$-5279.30 \leq \alpha_{70\%} \leq 16218.0$
80	98.80%	172299.12 a	-2425.61	$-27786.90 \leq \alpha_{80\%} \leq 22935.60$
10	99.92%	122995.47 b	2716.59	$-1935.90 \leq \alpha_{10\%} \leq 7369.08$
0	99.96%	120500.17 b	1262.60	$-1976.52 \leq \alpha_{0\%} \leq 4501.71$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Hierro (Fe)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 59.4845$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 67.3973$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvo un grupo homogéneo de pendientes: $\beta_{90} = \beta_{70} = \beta_{80}$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 33).

Tabla 33. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Fe.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	99.46%	18167.13 a	2831.41	$-15099.50 \leq \alpha_{100\%} \leq 20762.30$
90	99.79%	15571.98 b	5502.46	$-3993.03 \leq \alpha_{90\%} \leq 14998.00$
70	99.64%	15321.23 b	5680.05	$-6598.76 \leq \alpha_{70\%} \leq 17958.90$
80	99.84%	15236.44 b	5023.05	$-3117.82 \leq \alpha_{80\%} \leq 13163.90$
10	99.90%	12800.32 c	2995.31	$-2355.53 \leq \alpha_{10\%} \leq 8346.15$
0	99.98%	10489.10 d	-1209.78	$-3045.52 \leq \alpha_{0\%} \leq 625.96$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Potasio (K)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 20.9577$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de

igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 21.1705$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron dos grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{70}$ y $\beta_{10} = \beta_0$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 34).

Tabla 34. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento K.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta\%$)	Intercepto ($\alpha\%$)	IC del 95% para $\alpha\%$
100	98.54%	41220.70 a	28219.7	$-38758.9 \leq \alpha_{100\%} \leq 95198.3$
90	98.65%	39156.75 a	36294.55	$-24941.6 \leq \alpha_{90\%} \leq 97530.7$
80	98.61%	37144.74 a	42778.11	$-16169.4 \leq \alpha_{80\%} \leq 101726.0$
70	98.49%	36037.51 a	33144.75	$-26401.7 \leq \alpha_{70\%} \leq 92691.2$
10	99.59%	27826.76 b	13778.52	$-9999.74 \leq \alpha_{10\%} \leq 37556.8$
0	99.93%	22536.88 b	2792.39	$-5090.63 \leq \alpha_{0\%} \leq 10675.4$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Magnesio (Mg)

Resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 30} = 2.1576$, $P = 0.0507$). En la tabla 35 se presentan las estimaciones de los interceptos y pendientes de las curvas de calibración. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 35).

Tabla 35. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Mg.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente ($\beta\%$)	Intercepto ($\alpha\%$)	IC del 95% para $\alpha\%$
0	99.73%	213503.57	63697.17	$-46484.2 \leq \alpha_{0\%} \leq 173879.0$
10	98.84%	231841.12	135076.74	$-115572.0 \leq \alpha_{10\%} \leq 385726.0$
70	97%	247575.62	234361.43	$-200352.0 \leq \alpha_{70\%} \leq 669075.0$
80	96.82%	228562.07	296979.97	$-116310.0 \leq \alpha_{80\%} \leq 710270.0$
90	96.14%	218275.00	304372.97	$-132224.0 \leq \alpha_{90\%} \leq 740970.0$
100	97.73%	270582.76	301923.33	$-109442.0 \leq \alpha_{100\%} \leq 713289.0$

Manganeso (Mn)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 56.0273$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 66.0332$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron dos grupos homogéneos de pendientes: β_{100}

= β_{90} y $\beta_{70} = \beta_{80}$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 36).

Tabla 36. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Mn.

Etanol (% v/v)	R ²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	99.74%	75710.20 a	3196.15	$-1996.21 \leq \alpha_{100\%} \leq 8388.51$
90	99.23%	74804.77 a	-1948.69	$-10780.70 \leq \alpha_{90\%} \leq 6883.36$
70	99.89%	64956.51 b	1588.37	$-1237.93 \leq \alpha_{70\%} \leq 4414.67$
80	98.97%	63431.76 b	-961.73	$-9597.81 \leq \alpha_{80\%} \leq 7674.36$
10	99.89%	50420.84 c	1172.53	$-1049.67 \leq \alpha_{10\%} \leq 3394.73$
0	99.96%	39671.48 d	455.07	$-559.06 \leq \alpha_{0\%} \leq 1469.20$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Sodio (Na)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 18} = 28.7895$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 18} = 26.6885$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90}$, $\beta_{90} = \beta_{80} = \beta_{70}$ y $\beta_{10} = \beta_0$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 37).

Tabla 37. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Na.

Etanol (% v/v)	R ²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	98.81%	690689.87 a	112135.97	$-214359 \leq \alpha_{100\%} \leq 438631$
90	98.43%	579568.54 a b	135620.45	$-179918 \leq \alpha_{90\%} \leq 451158$
80	98.07%	534680.03 b	136970.39	$-186748 \leq \alpha_{80\%} \leq 460689$
70	99.77%	505234.20 b	44345.94	$-60938.7 \leq \alpha_{70\%} \leq 149631.0$
10	99.96%	350038.93 c	11571.78	$-19415.4 \leq \alpha_{10\%} \leq 42559.0$
0	99.99%	247539.47 c	3720.17	$-8614.0 \leq \alpha_{0\%} \leq 16054.3$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Níquel (Ni)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 17.1526$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 17.7693$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron tres grupos homogéneos de pendientes: β_{70} , $\beta_{90} = \beta_{100} = \beta_{80}$ y $\beta_{100} = \beta_{80} = \beta_{10} = \beta_0$. Respecto a los seis interceptos, el IC del 95% para

100% de etanol no contiene al cero, por lo que el intercepto de esta curva de calibración difirió de cero; como ambos límites de confianza son positivos dicho intercepto resultó significativamente mayor que cero (tabla 38).

Tabla 38. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Ni.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
70	99.33%	28618.96 a	1662.84	$-1486.17 \leq \alpha_{70\%} \leq 4811.84$
90	98.19%	24500.02 b	176.66	$-4269.46 \leq \alpha_{90\%} \leq 4622.77$
100	99.03%	21302.08 b c	4091.12	$1274.12 \leq \alpha_{100\%} \leq 6908.12$
80	98.04%	20916.47 b c	258.12	$-3690.41 \leq \alpha_{80\%} \leq 4206.65$
10	99.85%	18862.77 c	672.17	$-310.58 \leq \alpha_{10\%} \leq 1654.93$
0	99.96%	18296.65 c	206.86	$-303.26 \leq \alpha_{0\%} \leq 716.98$

*Pendientes con distinta letra difieren (P < 0.05), prueba de Tukey.

Plomo (Pb)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 172.9536$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 206.7660$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvo un grupo homogéneo de pendientes: $\beta_{70} = \beta_{10} = \beta_0$. Respecto a los seis interceptos: 1) tres IC contienen al cero (curvas al 100%, 90% y 80% v/v de etanol), por lo que los interceptos de dichas curvas no difieren significativamente de cero; y 2) tres IC no contienen al cero (curvas al 70%, 10% y 0% v/v de etanol), por lo que los interceptos de dichas curvas difieren de cero; como ambos límites de confianza son positivos cada intercepto resultó significativamente mayor que cero (tabla 39).

Tabla 39. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Pb.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
100	98.53%	6141.42 a	23.56	$-980.21 \leq \alpha_{100\%} \leq 1027.31$
90	98.16%	5309.56 b	83.38	$-889.44 \leq \alpha_{90\%} \leq 1056.19$
80	98.44%	4135.65 c	-90.22	$-785.82 \leq \alpha_{80\%} \leq 605.38$
70	99.84%	427.44 d	23.60	$0.64 \leq \alpha_{70\%} \leq 46.56$
10	96.82%	118.17 d	44.86	$16.25 \leq \alpha_{10\%} \leq 73.47$
0	92.68%	109.64 d	76.05	$34.86 \leq \alpha_{0\%} \leq 117.23$

*Pendientes con distinta letra difieren (P < 0.05), prueba de Tukey.

Selenio (Se)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 35.2771$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 52.3494$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron dos grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{100} = \beta_{90}$ y $\beta_{70} = \beta_{80}$. Respecto a los seis interceptos: 1) tres IC contienen al cero (curvas al 90%, 70% y 10% v/v de etanol), por lo que los interceptos de dichas curvas no difieren significativamente de cero (tabla 33), 2) dos curvas (100% y 80% v/v de etanol) resultaron significativamente menores que cero y, 3) un IC (0% v/v de etanol) tiene ambos límites positivos, por lo que el intercepto resultó significativamente mayor que cero (tabla 40).

Tabla 40. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Se.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* ($\beta_{\%}$)	Intercepto ($\alpha_{\%}$)	IC del 95% para $\alpha_{\%}$
100	93.04%	7496.19 a	-3602.61	$-6342.22 \leq \alpha_{100\%} \leq -862.99$
90	98.92%	6921.11 a	-193.45	$-1159.48 \leq \alpha_{90\%} \leq 772.59$
70	99.06%	4430.79 b	-290.05	$-867.02 \leq \alpha_{70\%} \leq 286.92$
80	98.99%	4377.47 b	-698.80	$-1289.97 \leq \alpha_{80\%} \leq -107.63$
10	98.25%	1252.09 c	28.63	$-194.65 \leq \alpha_{10\%} \leq 251.91$
0	92.57%	914.78 d	524.71	$178.32 \leq \alpha_{0\%} \leq 871.11$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Estroncio (Sr)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 13.4878$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 13.1997$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron dos grupos homogéneos de pendientes: $\beta_{90} = \beta_{100} = \beta_{80} = \beta_{70}$ y $\beta_{70} = \beta_0 = \beta_{10}$. Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 41).

Tabla 41. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Sr.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
90	97.56%	984344.80 a	37245.88	$-170987 \leq \alpha_{90\%} \leq 245479$
100	97.75%	971954.53 a	148717.28	$-48143.1 \leq \alpha_{100\%} \leq 345578.0$
80	97.62%	890342.20 a	27608.02	$-158220 \leq \alpha_{80\%} \leq 213436$
70	99.01%	854105.99 a	70983.70	$-43045.7 \leq \alpha_{70\%} \leq 185013.0$
0	99.90%	623620.45 b	15933.22	$-10654.0 \leq \alpha_{0\%} \leq 42520.4$
10	99.74%	617643.56 b	26065.30	$-15893.1 \leq \alpha_{10\%} \leq 68023.7$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

Zinc (Zn)

No resultaron coincidentes las curvas de calibración obtenidas al utilizar seis concentraciones de etanol ($F_{10, 36} = 54.7636$, $P < 0.0001$). Al realizar la prueba de igualdad de pendientes, éstas difirieron significativamente ($F_{5, 36} = 62.3360$, $P < 0.0001$). De las comparaciones múltiples se tuvieron cuatro grupos homogéneos de pendientes: $\beta_0 = \beta_{90}$, $\beta_{90} = \beta_{100} = \beta_{70}$, $\beta_{100} = \beta_{70} = \beta_{80}$ y β_{10} . Respecto a los seis interceptos, todos los IC del 95% contienen al cero, por lo que ninguno difirió significativamente de cero (tabla 42).

Tabla 42. Coeficientes estimados de las seis curvas de calibración del elemento Zn.

Etanol (% v/v)	R²	Pendiente* (β%)	Intercepto (α%)	IC del 95% para α%
0	99.91%	14492.59 a	308.75	$-275.23 \leq \alpha_{0\%} \leq 892.74$
90	97.94%	12775.98 a b	307.13	$-2166.20 \leq \alpha_{90\%} \leq 2780.45$
100	98.47%	12199.00 b c	1370.26	$-659.20 \leq \alpha_{100\%} \leq 3399.71$
70	99.43%	11863.11 b c	693.03	$-505.27 \leq \alpha_{70\%} \leq 1891.33$
80	98.13%	10390.23 c	182.62	$-1735.32 \leq \alpha_{80\%} \leq 2100.56$
10	99.77%	3348.83 d	158.08	$-55.68 \leq \alpha_{10\%} \leq 371.83$

*Pendientes con distinta letra difieren ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

