

Controle de Qualidade da Própolis



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 268

Controle de Qualidade da Própolis

*Ana Lúcia Horta Barreto
Maria Teresa do Rêgo Lopes
Fábia de Mello Pereira
Bruno de Almeida Souza*

***Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2020***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650,
Bairro Buenos Aires

Caixa Postal 01

CEP 64008-480, Teresina, PI

Fone: (86) 3198-0500

Fax: (86) 3198-0530

www.embrapa.br/meio-norte

Serviço de Atendimento ao

Cidadão(SAC)

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável

Presidente

Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo

Secretário-administrativo

Jeudys Araújo de Oliveira

Membros

Edvaldo Sagrilo, Orlane da Silva Maia, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Lígia Maria Rolim Bandeira, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araújo Neto, Antônio de Pádua Soeiro Machado, Alexandre Kemenes, Ana Lúcia Horta Barreto, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Francisco José de Seixas Santos, João Avelar Magalhães, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara

Supervisão editorial

Lígia Maria Rolim Bandeira

Revisão de texto

Francisco de Assis David da Silva

Normalização bibliográfica

Orlane da Silva Maia

Editoração eletrônica

Jorimá Marques Ferreira

Foto da capa

Maria Teresa do Rêgo Lopes **1ª edição**

1ª impressão (2020): formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Meio-Norte

Controle de Qualidade da Própolis / Ana Lúcia Horta Barreto ... [et al.]. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2020.

48p. : il. ; 16 cm x 22 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 268).

1. Própolis. 2. Sistema de produção. 3. Análise físico-química. 4. Controle de qualidade. I. Barreto, Ana Lúcia Horta. II. Lopes, Maria Teresa do Rêgo. III. Pereira, Fábila de Mello. IV. Souza, Bruno de Almeida. V. Embrapa Meio-Norte. VI. Série.

CDD 638.16 (21. ed.)

Orlane da Silva Maia (CRB 3/915)

© Embrapa, 2020

Autores

Ana Lúcia Horta Barreto

Química Industrial, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI

Maria Teresa do Rêgo Lopes

Engenheira-agrônoma, doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI

Fábia de Mello Pereira

Engenheira-agrônoma, doutora em Zootecnia, pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI

Bruno de Almeida Souza

Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI

Apresentação

A apicultura tem se destacado como uma importante atividade agropecuária no Brasil, tendo o mel como principal produto. No entanto, outros produtos das abelhas apresentam grande potencial para diversificar a produção apícola e possibilitar incremento na renda, a exemplo da própolis, com alto valor agregado e relativa facilidade no processo produtivo.

A própolis é produzida a partir de resinas, exsudatos e tecidos vegetais aos quais as abelhas acrescentam cera, secreções salivares e pólen. Em função de sua expressiva atividade biológica, tem sido utilizada desde a antiguidade para fins terapêuticos em humanos e animais. O uso de extratos de própolis tem sido crescente em produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal, em atendimento à demanda do mercado por produtos naturais.

A própolis brasileira desperta grande interesse no mercado internacional em função de suas propriedades biológicas, sensoriais e por se apresentar livre de substâncias contaminantes prejudiciais à saúde. No entanto, em função da diversidade de sua origem botânica, é comum encontrar variações em sua composição física e química, que também sofre interferências de fatores genéticos e das condições ambientais. Além disso, as características da própolis podem ser alteradas durante os processos de coleta e beneficiamento, o que pode comprometer a qualidade do produto e sua comercialização.

O controle de qualidade da própolis é imprescindível para atender um mercado cada vez maior e exigente em todo o mundo, de forma a garantir que o produto seja comercializado com as suas propriedades naturais preservadas, que possua características que facilitem sua utilização e que tenha uma adequada conservação e apresentação.

Nesse contexto, a Embrapa apresenta o documento Controle de Qualidade da Própolis com o objetivo de divulgar informações essenciais sobre o sistema de produção de própolis e as metodologias para as análises físico-químicas exigidas pela legislação brasileira para o controle de qualidade do produto. A publicação enfatiza as análises laboratoriais para determinação dos padrões qualitativos da própolis, o que pode ser de grande utilidade para técnicos, laboratoristas e produtores, além de favorecer a obtenção de um produto cada vez mais competitivo no mercado mundial.

Luiz Fernando Carvalho Leite

Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Sumário

Introdução.....	8
Própolis: definição e características	9
Elaboração e utilização da própolis.....	9
Composição da própolis	11
Produção da própolis.....	13
Controle de qualidade da própolis.....	16
Preparo de amostras de própolis para realização de análises físico-químicas	16
Obtenção do extrato etanólico de própolis por Soxhlet.....	17
Análises Físico-químicas.....	19
Perda por dessecação (umidade)	19
Determinação de cinzas (material mineral)	21
Massa mecânica (resíduo insolúvel em etanol)	23
Determinação de cera	26
Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Denis ...	29
Determinação do teor de flavonoides.....	34
Determinação da atividade de oxidação (índice de oxidação)	39
Determinação de resíduo seco (solúveis em etanol)	42
Referências	44

Introdução

A própolis tem ocupado lugar de destaque nos mercados nacional e internacional de produtos apícolas, principalmente em razão das diferentes atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos (Lustosa et al., 2008), o que tem estimulado seu uso como produto terapêutico e/ou nutracêutico para humanos e animais. O crescente interesse pela própolis e seu elevado valor agregado têm motivado apicultores a investirem em sua produção, empregando técnicas que promovam maior produtividade e melhor qualidade.

Uma vez que a própolis é produzida a partir de resinas, exsudatos e tecidos vegetais, ocorre grande variação em sua composição e características em função das espécies botânicas que as abelhas visitam para coleta desses materiais, além de fatores ambientais e genéticos, o que dificulta a padronização do produto. Além disso, as características da própolis podem ser alteradas tanto durante o processo produtivo como nas etapas de coleta e beneficiamento, o que pode interferir na qualidade do produto e comprometer sua comercialização.

No Brasil, para garantir a qualidade da própolis, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis, descrito na Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Nesse documento, constam os requisitos mínimos de qualidade que a própolis deve atender, entre os quais se destacam os requisitos físico-químicos, indispensáveis a garantir a pureza e as propriedades biológicas características do produto.

Nesse contexto, com o intuito de contribuir para a caracterização e para o controle da qualidade da própolis, esta publicação apresenta informações básicas sobre seu sistema de produção e as metodologias empregadas nas análises físico-químicas exigidas pela legislação brasileira.

Própolis: definição e características

Por definição, própolis é o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (Brasil, 2001). Tem aroma característico (balsâmico e resinoso) e cor que pode apresentar-se amarelada, parda, vermelho-escura, verde-limão, cinza esverdeada e café, conforme sua origem e tempo após a colheita do produto (Ghisalberti, 1979; Couto; Couto, 2002). Sua consistência pode variar de maleável a rígida (Brasil, 2001), podendo-se obter amostras com texturas dura e friável, enquanto outras podem ser elásticas e gomosas (Salatino et al., 2005).

O uso da própolis pelas abelhas está relacionado à proteção da colônia. O termo própolis traduz exatamente essa função, pois é derivado do grego “pro” (em defesa) e “polis” (cidade), o que quer dizer em defesa da cidade ou da colmeia (Ghisalberti, 1979).

Elaboração e utilização da própolis

Para elaboração da própolis, as abelhas coletam resinas de ramos, folhas, caules, gemas apicais e axilares das plantas. Essa massa de resina é manipulada, com o auxílio das mandíbulas e pernas, e transferida para as corbículas, cavidade nas pernas posteriores, por onde é levada à colmeia. Nesse processo, são acrescentados secreções salivares e grãos de pólen, quando presentes. Na colmeia, as abelhas misturam o material resinoso com cera e saliva, moldando-o antes de depositar no local adequado (Figura 1).

Foto: Maria Teresa do R. Lopes



Figura 1. Abelhas depositando própolis em abertura na colmeia.

Em razão das atividades antimicrobianas da própolis, as abelhas a utilizam como produto higienizador sobre os favos e paredes internas do ninho e para recobrir animais mortos que não conseguem remover da colmeia, evitando assim sua decomposição e contaminação do ambiente (Reis et al., 2000). As paredes dos alvéolos são revestidas com uma mistura de cera e própolis, provavelmente para conferir maior rigidez à estrutura e para proporcionar um ambiente asséptico, permitindo o desenvolvimento da cria (Salatino et al., 2005). Por suas propriedades mecânicas, a própolis é utilizada também para vedação ou redução de aberturas na colmeia, o que auxilia na regulação da temperatura interna e na defesa contra inimigos naturais (Couto; Couto, 2002; Funari; Ferro, 2006).

A própolis tem sido utilizada para fins terapêuticos em humanos e animais, em virtude de suas propriedades farmacológicas. Existem registros de seu emprego há muitos séculos e de diversas formas pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito, era denominada “cera negra” e utilizada para embalsamar mortos (Castaldo; Capasso, 2002; Pereira et al., 2002). Vários trabalhos científicos têm demonstrado que a própolis apresenta atividades bactericidas, bacteriostáticas, antifúngicas, analgésicas, cicatrizantes, anti-inflamatórias, antioxidantes, entre outras (Marcucci, 1995; Kujumgiev et al., 1999; Pinto et al., 2001; Pereira et al., 2002; Lustosa et al., 2008).

Em razão dessas características, a própolis tem sido empregada na elaboração de produtos cosméticos, farmacêuticos e de higiene pessoal, bem como utilizada em suplementos alimentares. Atualmente, é disponível em várias formas como extratos, cápsulas, enxaguatório bucal, na forma de pó, entre outras (Lustosa et al., 2008).

Composição da própolis

A composição da própolis varia de acordo com a região onde é produzida, com a planta visitada pela abelha para coleta de resina, com o período de coleta e com a espécie de abelha coletora, o que explica a diversidade de atividades biológicas apresentadas pelo produto (Ghisalberti, 1979; Salatino et al., 2005; Lopez, 2017). Sua composição média básica é de 50% de resina de plantas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, 5% de outras matérias orgânicas e substâncias coletadas (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995), secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto.

Entre as diversas substâncias constituintes da própolis, destacam-se fenóis, flavonoides, triterpenoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas A, B1, B2, B6, C e E, bem como os minerais Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr. Entre essas, os flavonoides e os ácidos fenólicos merecem destaque, pois são atribuídas a eles importantes atividades farmacológicas (Salatino et al., 2005; Funari; Ferro, 2006; Lustosa et al., 2008). Os teores dessas substâncias são utilizados como parâmetros para o controle da qualidade da própolis (Brasil, 2001).

A própolis brasileira apresenta características e composição bastante variáveis em virtude da grande diversidade botânica do País, já que em diferentes ecossistemas as abelhas recorrem a distintas espécies vegetais como fontes de matérias-primas empregadas em sua elaboração (Bastos et al., 2011), o que vai refletir em características sensoriais diferenciadas, como coloração e textura (Figura 2), além de diferenças na composição química e na atividade biológica, de acordo com sua origem (Castro et al., 2007). Isso tem incentivado a realização de estudos sobre os constituintes químicos de amostras de própolis de diferentes regiões (Marcucci, 1995; Marcucci et al., 2000, 2001; Citó et al., 2004; Salatino et al., 2005; Sousa et al., 2007; Righi, 2008; Oldoni et al., 2011; Lopez, 2017).



Foto: Maria Teresa do R. Lopes

Figura 2. Diferenças na coloração de amostras de própolis produzidas em municípios do estado do Piauí, em diferentes períodos. Campo Maior (A) e Castelo do Piauí (B e C).

Mesmo para a própolis produzida no mesmo local, ocorrem variações em suas características em função do período de colheita e das diferenças genéticas entre colônias (Silva et al., 2006).

A própolis produzida no Cerrado brasileiro, que tem como principal fonte vegetal a espécie *Baccharis dracunculifolia* D.C. (alecrim) (Bastos et al., 2000; Bastos, 2001), é conhecida, internacionalmente, como própolis verde ou própolis brasileira e é rica em derivados prenilados do ácido-p-cumárico (Marcucci; Bankova, 1999). A própolis verde é amplamente consumida no Japão como suplemento alimentar, na prevenção de doenças, bem como devido à sua atividade antitumoral, que está relacionada principalmente com os ácidos fenólicos drupamina, artepilinC e bacarina (Soares, 2008).

Outro tipo de própolis, de coloração vermelha, oriunda dos manguezais dos estados da Paraíba, de Pernambuco, de Alagoas, de Sergipe e da Bahia, passou a ter recentemente repercussão internacional. Essa própolis é produzida a partir de um exsudato resinoso vermelho secretado pela espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., uma leguminosa pertencente à família Fabaceae. A “própolis vermelha” apresenta composição diferente dos 12 tipos discriminados por Park et al. (2002), com quantidades elevadas de isoflavonoides (Alencar et al., 2007; Silva et al., 2008) e elevada atividade antioxidante e antimicrobiana (Cabral et al., 2009; Aguiar et al., 2018). Park et al. (2002) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos com base em

suas características físico-químicas e também investigaram a sua origem botânica por métodos cromatográficos. Cinco tipos no sul do Brasil (2 tipos do Rio Grande do Sul), 1 no grupo do sudeste do Brasil e 6 no grupo do Nordeste do Brasil.

Os constituintes voláteis presentes na própolis, como mono e sesquiterpenos, fenilpropanoides, η -alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres, apesar de estarem em menor proporção quando comparados a outros compostos, também podem ser bastante úteis para sua caracterização, uma vez que estão envolvidos na atividade antimicrobiana e podem fornecer valiosas informações acerca da origem botânica da própolis (Torres et al., 2008).

Produção da própolis

Por apresentar alto valor agregado, a própolis pode ser uma alternativa de renda importante para o apicultor. Os preços variam de acordo com sua qualidade, origem botânica e mercado a que é destinada. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de própolis, perdendo apenas para a Rússia e para a China, com cerca de dois terços de sua produção destinada à exportação. Minas Gerais lidera a produção nacional (Sebrae-BA, 2017).

A própolis brasileira tem despertado grande interesse no mercado internacional, especialmente no Japão, principal importador do produto. Esse interesse se deve às propriedades farmacológicas (bactericidas, antifúngicas, antioxidantes, cicatrizantes, entre outras), já demonstradas em vários trabalhos científicos (Marcucci, 1995; Kujumgiev et al., 1999; Pinto et al., 2001; Pereira et al., 2002; Lustosa et al., 2008), às características sensoriais e ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais presentes na própolis brasileira (Pereira et al., 2002).

A própolis é produzida quando as abelhas percebem a necessidade de vedar aberturas na colmeia, seja para garantir condições adequadas de

temperatura e umidade no ninho, seja para evitar a entrada de inimigos naturais. Assim, quando se pretende estimular a produção de própolis, podem ser utilizados diferentes tipos de coletores que promovem aberturas na colmeia. Quando as abelhas detectam essas aberturas, vedam-nas com própolis.

Entre os diferentes métodos de produção de própolis, destacam-se: a) raspagem da própolis depositada nas diferentes partes da colmeia (alvado, fundo, tampa, quadros, laterais, etc.); b) colocação de peças para criar aberturas de 1 cm a 3 cm entre os componentes da colmeia (tampa, melgueiras e ninho); c) uso de tela plástica colocada entre a melgueira e a tampa; d) abertura de janelas laterais nas melgueiras e/ou ninho, com inserções de quadros móveis para manejo, como é o caso do Coletor de Própolis Inteligente (CPI), que consiste de uma caixa (melgueira ou ninho) com peças móveis nas laterais, que vão sendo retiradas a fim de formar uma placa de própolis; entre outros (Breyer et al., 2016).

A própolis produzida com o auxílio de coletores é, geralmente, mais limpa e pura do que aquela obtida por raspagem, o que favorece a manutenção de sua qualidade e propicia a obtenção de melhor valor na comercialização. Coletores que apresentam quadros móveis que podem ser retirados das laterais da colmeia e substituídos por outros vazios, como o modelo “Tira e Põe” (Brighenti et al., 2006), apresentam a vantagem de que a própolis pode ser retirada da peça em local adequado, o que favorece a manutenção de sua qualidade (Breyer et al., 2016), Figura 3.

Entretanto, as várias técnicas de produção de própolis apresentam vantagens e desvantagens e, como a produção varia com as condições ambientais e com fatores genéticos das abelhas (Santos, 1996; Santana, 2003), as diferentes técnicas necessitam ser testadas e adaptadas a cada região e ao manejo dos apicultores. O apicultor deve adotar aquele que melhor corresponde às condições de sua região (clima, fauna e flora) e tipos de apicultura (fixa ou migratória).



Foto: Maria Teresa do R. Lopes

A



Foto: Maria Teresa do R. Lopes

B



Foto: Bruno de Almeida Souza

C



Foto: Bruno de Almeida Souza

D

Figura 3. Etapas de produção e coleta de própolis: colmeia com coletor de própolis-melgueira com quadros móveis (A); Própolis depositada nos quadros móveis do coletor. (B); retirada da própolis do quadro (C); acondicionamento da própolis para posterior realização de análises de qualidade (D).

Controle de qualidade da própolis

Para garantir o controle da qualidade da própolis e possibilitar sua comercialização para os mercados interno e externo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou, em 2001, uma legislação específica com padrões de identidade e qualidade da própolis produzida no País. Esse regulamento consta na Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), em que são estabelecidos os requisitos físico-químicos para avaliação da qualidade da própolis bruta (Tabela 1).

Tabela 1. Requisitos físico-químicos e limites estabelecidos pela legislação brasileira para avaliação da qualidade da própolis bruta.

Requisitos físico-químicos	Limites estabelecidos pela Legislação Brasileira
Perda por dessecação	Máximo de 8% (m/m)
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)
Cera	Máximo de 25% (m/m)
Compostos fenólicos	Mínimo de 5% (m/m)
Flavonoides	Mínimo de 0,5% (m/m)
Atividade de oxidação	Máximo de 22 segundos
Massa mecânica	Máximo de 40% (m/m)
Solúveis em etanol	Mínimo de 35% (m/m)

Fonte: Adaptada de Brasil (2001).

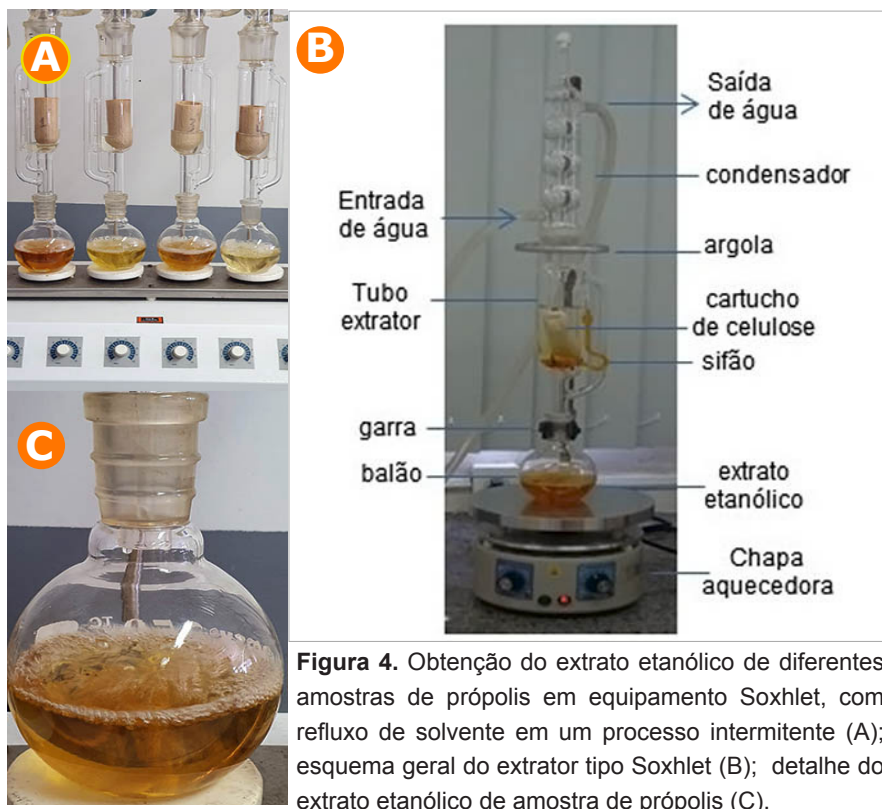
Preparo de amostras de própolis para realização de análises físico-químicas

As amostras de própolis bruta coletadas nas colônias devem ser limpas, retirando-se poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer tipo de material estranho. Após separação de impurezas, cada amostra é acondicionada em recipientes ou sacos plásticos com boa vedação, ao abrigo da luz e em freezer. A própolis é congelada para tornar

a sua trituração mais fácil. Sem o congelamento, é impossível fragmentá-la em pequenas partículas para melhorar a extração. As amostras de própolis são pulverizadas com o auxílio de almofariz, homogeneizadas, pesadas e armazenadas em freezer.

Obtenção do extrato etanólico de própolis por Soxhlet

As amostras de própolis, depois de maceradas, são extraídas em etanol a quente, em aparelho do tipo Soxhlet (Figura 4), permanecendo em refluxo por 8 horas (Woisky, 1996). O extrato etanólico obtido é armazenado em geladeira por 24 horas para análise posterior do teor de ceras.



Materiais

- Balões volumétricos de 100 mL e 250 mL
- Balão de fundo chato de 250 mL
- Cartucho extrator
- Conjunto de extrator de Soxhlet
- Dessecador
- Espátula
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Funil
- Kitasato
- Papel-toalha
- Papel-filtro
- Pérolas de vidro
- Piceta
- Pinça
- Proveta de 200 mL
- Vidro de relógio

Equipamentos

- Balança analítica
- Bomba de vácuo
- Capela de exaustão
- Estufa
- Freezer
- Placa aquecedora
- Refrigerador

Reagente: etanol

Procedimento

- Colocar o conjunto de papel-filtro e cartucho de extração (que será utilizado para colocar a amostra de própolis) por 1 hora em estufa a 105 °C.
- Após o término do tempo, retirar o conjunto, colocar em placa de Petri no dessecador e aguardar o resfriamento.
- Pesar e anotar os valores do conjunto cartucho + papel.
- Pesar no papel-filtro aproximadamente 2,5 g de própolis bruta pulverizada, dobrar o papel-filtro de forma que a amostra de própolis fique bem-acondicionada.
- Colocar o papel com própolis no cartucho e condicioná-lo no extrator de Soxhlet (P1= peso do papel + própolis + cartucho).
- Colocar pérolas de vidro ou porcelana e aproximadamente 170 mL de etanol em um balão de fundo chato de 250 mL.
- Acoplar o balão com solvente em um sistema de extração por Soxhlet (Figura 4) e deixar em refluxo por 8 horas.
- Retirar o balão com o extrato de própolis do sistema de refluxo.
- Armazenar em geladeira por 24 horas para análise posterior do teor de ceras (tempo superior não prejudica o resultado da análise).
- Transferir o extrato etanólico para um balão volumétrico de 100 mL depois da retirada da cera por filtração e completar o volume para uso nas demais análises.

Análises físico-químicas

Perda por dessecação (umidade)

A análise da perda por dessecação é utilizada para determinar o teor de umidade da amostra de própolis. Se o local onde a própolis foi depositada na colmeia tiver contato direto com o ambiente externo, podem ocorrer variações no teor de umidade (Franco et al., 2000; Melo et al., 2012), com implicações na qualidade final do produto. Um elevado teor de umidade na própolis pode favorecer o crescimento de fungos e tornar

o produto impróprio para consumo e comercialização, visto que o limite máximo permitido para esse parâmetro pela legislação brasileira é de 8% (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na medida gravimétrica da perda por dessecação em amostras de própolis, utilizando-se estufa à temperatura de 105 °C. A metodologia de análise utilizada é baseada na diferença de massa, antes da secagem da amostra em estufa e depois da secagem. A perda de massa não é devido somente à água removida, mas também a outras substâncias que se volatilizam nessas condições (Farmacopeia Brasileira, 1998; AOAC International, 1995). Essa análise é realizada em triplicata e a perda por dessecação a 105 °C é calculada pela razão entre a massa do material volatilizado e a massa inicial de própolis, em porcentagem.

Materiais

- Dessecador
- Cadinho de porcelana
- Espátula
- Pinça

Equipamentos

- Estufa
- Balança analítica

Procedimento

- Colocar três cadinhos (triplicata) identificados no fundo com lápis grafite em uma estufa a 105 °C por 1 hora.
- Desligar a estufa, retirar os cadinhos com o auxílio de uma pinça e colocar em um dessecador por aproximadamente 60 minutos.
- Pesar os cadinhos em balança analítica e anotar o peso 1 (P1).

- Pesar aproximadamente 3,0 g da amostra de própolis em cada cadinho e levar à estufa a 105 °C por 2 horas.
- Retirar os cadinhos da estufa com o auxílio de uma pinça e colocar no dessecador até esfriar.
- Pesar os cadinhos e anotar o peso 2 (P2).
- Calcular a perda por dessecação (umidade) em própolis usando-se a equação abaixo:

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = \frac{P2 - P1}{W} \times 100$$

Em que:

P1 = peso do cadinho tarado a 105 °C

P2 = peso do cadinho + amostra seca a 105 °C

W = peso da amostra

Determinação de cinzas (material mineral)

A determinação do teor de cinzas representa a quantificação da matéria de origem mineral na amostra e é importante na avaliação da qualidade da própolis, pois teores elevados podem evidenciar possíveis adulterações do produto pela adição de areia ou outros materiais, especialmente em amostras na forma de pó (Woisky; Salatino, 1998), ou podem ser decorrentes de contaminações durante os procedimentos de coleta e manipulação do produto (Melo et al., 2012). Pela legislação vigente, o máximo permitido para o teor de cinzas em própolis é 5% (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na medida gravimétrica do teor de cinzas em própolis, utilizando-se mufla à temperatura de 600 °C (AOAC International, 1997a; Funari; Ferro, 2006). As determinações são feitas em triplicata e o resultado é expresso em porcentagem. O teor de cinzas é obtido ao se calcinar a própolis, eliminando-se toda a matéria orgânica, o que resulta em toda a matéria de origem mineral existente na amostra. No ma-

terial resultante, estão presentes metais como potássio, chumbo, cádmio, cobre, zinco, estanho, entre outros.

Materiais

- Dessecador
- Cadinho de porcelana
- Espátula
- Pinça para cadinho (35 cm ou maior)

Equipamentos

- Mufla
- Balança analítica

Procedimento

- Colocar três cadinhos (triplicata) identificados no fundo com lápis grafite em uma mufla a 600 °C por 30 minutos.
- Desligar a mufla e aguardar diminuir a temperatura para aproximadamente 200 °C.
- Retirar os cadinhos da mufla com o auxílio de uma pinça.
- Colocar os cadinhos em um dessecador por aproximadamente 2 horas.
- Pesar cada cadinho depois de frio em balança analítica e anotar o peso 1 (P1).
- Pesar aproximadamente 3 g da amostra de própolis em cada cadinho.
- Colocar em mufla a 600 °C por 5 horas.
- Desligar a mufla e aguardar diminuir a temperatura para aproximadamente 250 °C.
- Retirar os cadinhos da mufla com o auxílio de uma pinça e colocar no dessecador até esfriar.

- Pesar os cadinhos e anotar o peso (P2).
- Calcular o teor de cinzas (material mineral) em própolis usando-se a seguinte equação:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{P2 - P1}{W} \times 100$$

Em que:

P1 = peso do cadinho tarado a 600 °C

P2 = peso do cadinho tarado + amostra calcinada a 600 °C

W= peso da amostra de própolis

Massa mecânica (resíduo insolúvel em etanol)

O teor de massa mecânica refere-se às partículas incorporadas à própolis durante a sua elaboração pelas abelhas ou na sua retirada das colmeias, como fragmentos de folhas e insetos, pedaços de madeira, etc. Como indicador da qualidade da própolis, valores elevados desse parâmetro podem indicar colheita e processamento inadequados do produto ou adulteração (Sawaya et al., 2011; Melo et al., 2012). O valor máximo estabelecido pela legislação brasileira para massa mecânica em própolis é de 40% (m/m) (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na medida gravimétrica do teor de sólidos insolúveis em etanol em amostras de própolis, utilizando-se estufa à temperatura de 105 °C. O teor de resíduo insolúvel é calculado pela razão entre a massa do resíduo retido no cartucho no processo de obtenção do extrato etanólico de própolis e a massa inicial da amostra, sendo expresso em porcentual (Funari; Ferro, 2006; Matsuda, 2006; Melo et al., 2012).

Materiais

- Balões volumétricos de 100 mL e 250 mL
- Bequer de 250 mL
- Cartucho extrator
- Conjunto extrator de Soxhlet
- Dessecador
- Espátula
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Funil
- Kitasato
- Papel-toalha
- Papel-filtro
- Pérolas de vidro
- Piceta
- Pinça
- Proveta de 200 mL
- Vidro de relógio

• Equipamentos

- Balança analítica
- Bomba de vácuo
- Capela de exaustão
- Estufa
- Freezer
- Placa aquecedora
- Refrigerador

- **Reagente:** etanol

Procedimento

- Retirar o conjunto cartucho + papel com o resíduo insolúvel de própolis do extrator Soxhlet, depositar em um vidro de relógio e levar à capela de exaustão para evaporar o excesso de solvente por 1 hora.
- Secar o conjunto em estufa a 105 °C por 2 horas (Figura 5B).
- Retirar o conjunto da estufa com o auxílio de uma pinça e deixar esfriar em um dessecador por aproximadamente 30 minutos.
- Pesar o conjunto e repetir a operação até peso constante. Anotar o peso (Pc2).
- Calcular o teor de resíduo insolúvel conforme equação abaixo.

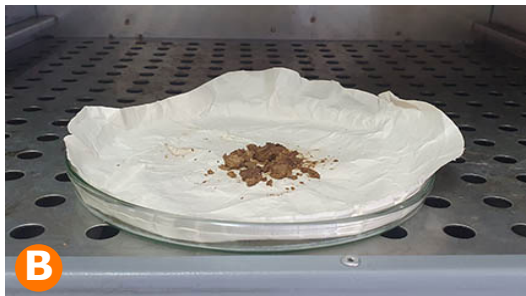
$$\text{Resíduo insolúvel (\%)} = \frac{Pc2 - Pc1}{W} \times 100$$

Em que:

Pc1 = peso do conjunto (cartucho + papel)

Pc2 = peso do conjunto (cartucho + papel + resíduo insolúvel)

W = peso da própolis



Fotos: Maria Teresa do R. Lopes

Figura 5. Resíduo insolúvel em etanol e extrato etanólico de amostra de própolis (A); resíduo insolúvel em etanol em estufa de secagem (B).

Determinação de cera

A cera é naturalmente adicionada no processo de elaboração da própolis pelas abelhas, no entanto maior quantidade de cera pode ser incorporada à própolis, de acordo com a necessidade da colônia. Isso pode acontecer em períodos em que as abelhas necessitam vedar a colmeia, como no inverno ou em períodos chuvosos, mas não encontram quantidade suficiente de resinas na vegetação (Silva et al., 2006; Sawaya et al., 2011). Portanto valores elevados de cera implicam menor teor de resinas e de demais substâncias responsáveis pelas atividades biológicas da própolis (Woisky; Salatino, 1998; Funari; Ferro, 2006), o que torna desejável a obtenção de amostras com menores teores de cera. Nesse sentido, a legislação brasileira estabelece o valor máximo de 25% para o teor de cera em amostras de própolis bruta (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na medida gravimétrica do teor de ceras em amostras de própolis, utilizando-se estufa à temperatura de 105 °C (Funari; Ferro, 2006). O teor de cera é determinado a partir da amostra previamente triturada, pesada em cartucho de celulose e extraída em aparelho Soxhlet com etanol absoluto. Baseia-se na quantificação de todo o material da amostra solúvel em etanol a quente e insolúvel em etanol a frio. Essas propriedades físicas são inerentes às classes de constituintes comumente encontradas em ceras de abelhas, como os alcanos, os ésteres, os cetonas e os álcoois de cadeia longa e linear, todos derivados de ácidos graxos. O teor de cera é calculado pela razão entre a massa de material retido no filtro e a massa inicial de própolis utilizada na extração, sendo expresso em porcentagem.

Materiais

- Balões volumétricos de 100 mL e 250 mL
- Béquer de 100 mL e 250 mL
- Capela

- Cartucho extrator
- Conjunto de extrator Soxhlet
- Dessecador
- Espátula
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Funil
- Kitasato
- Papel-toalha
- Papel-filtro
- Pérolas de vidro
- Piceta
- Pinça
- Proveta de 100 mL
- Vidro de relógio

Equipamentos

- Balança analítica
- Bomba de vácuo
- Estufa
- Freezer
- Placa aquecedora
- Refrigerador

Reagente: etanol

Extrato etanólico de própolis por Soxhlet: obtido conforme descrito no item anterior.

Procedimento

- Colocar o balão com o extrato etanólico de própolis no freezer por 30 minutos, após transcorrido o tempo de 24 horas em refrigeração, para precipitação da cera (Figura 6A).
- Efetuar a filtração com um papel-filtro previamente tarado [após secagem em estufa a 105 °C por 1 hora, resfriado por 30 minutos em dessecador, seguido de pesagem em balança analítica ($Pp1$ = peso do papel-filtro)]. Se necessário, usar um sistema de bomba de vácuo para auxiliar na filtração.
- Lavar a cera depositada no papel-filtro (resíduo da filtração) com porções de etanol resfriado a aproximadamente 16 °C, até o clareamento da cera.
- Aferir o extrato etanólico livre de cera em um balão de 100 mL, tendo o cuidado de juntar as porções de etanol usadas para lavagem do balão.
- Acondicionar em recipiente de vidro âmbar vedado e reservar para as demais análises.
- Depositar o papel-filtro com a cera em um vidro de relógio e deixar na capela para evaporar o solvente.
- Colocar o papel-filtro com a cera em uma estufa pré-aquecida a 105 °C por 2 horas.
- Retirar o papel-filtro com a cera da estufa (Figura 6B) com o auxílio de uma pinça e deixar esfriar em dessecador por aproximadamente 30 minutos.
- Pesar em balança analítica ($Pp2$ = peso do papel + cera) e repetir a operação até obter peso constante.
- Calcular o teor de cera (%) conforme equação abaixo.

$$\text{Teor de cera (\%)} = \frac{Pp2 - Pp1}{W} \times 100$$

Em que:

Pp1 = peso do papel tarado a 105 °C

Pp2 = peso do papel + cera seca a 105 °C

W = peso da amostra de própolis



Fotos: Maria Teresa do R. Lopes

Figura 6. Cera precipitada no extrato etanólico de própolis (A); resíduo de cera seco em estufa (B).

Determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Denis

Os compostos fenólicos fazem parte da composição química da própolis e estão diretamente relacionados às propriedades biológicas desse produto, entre as quais se destacam as atividades antimicrobianas e antioxidantes (Castro et al., 2007; Melo et al., 2012). O teor de compostos fenólicos depende da origem botânica, do local e da época de coleta da própolis (Silva et al., 2006; Melo et al., 2012; Ferreira et al., 2017).

Como a qualidade da própolis tem estreita relação com os níveis de compostos fenólicos, foi estabelecido pela legislação brasileira um limite

mínimo de 5% para essa classe de compostos em amostras de própolis bruta (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na análise de compostos fenólicos em amostras de própolis por meio de calorimetria, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível, com leituras na faixa do visível. Baseia-se na reação dos compostos fenólicos com o reagente de Folin-Denis e posterior quantificação espectrofotométrica a 760 nm. A metodologia de fenóis totais por Folin-Denis é uma reação de óxido-redução baseada no uso de compostos com estrutura fosfotúngstico-fosfomolibídica como reagente colorimétrico, cujo íon fenolato é oxidado nas condições alcalinas, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibídico, resultando em uma solução de coloração azul (AOAC International, 1997b; Woisky, 1996; Ângelo; Jorge, 2007).

Materiais

- Balões volumétricos de 50 mL, 250 mL, 500 mL e 1.000 mL
- Béquer de 100 mL, 250 mL, 500 mL e 1.000 mL
- Cartucho extrator
- Conjunto de extrator Soxhlet
- Cronômetro
- Cubeta de quartzo
- Dessecador
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Freezer
- Funil
- Kitasato
- Lenço de papel
- Mangueira de silicone
- Papel-filtro

- Pérolas de vidro
- Piceta
- Pinça
- Pipetas automáticas (1,0 mL a 10,0 mL)
- Placa aquecedora
- Proveta de 200 mL
- Vidro de relógio

Equipamentos

- Balança analítica
- Capela
- Compressor de ar
- Espectrofotômetro UV-Visível
- Refrigerador

Reagentes

- Ácido fosfomolibdico
- Ácido fosfórico
- Água destilada
- Carbonato de sódio anidro
- Etanol
- Quercetina
- Tungstato de sódio

Procedimento

Preparo de soluções:

Solução padrão de quercetina (200 µg/mL)

- Pesar 0,05 g de quercetina em um béquer de 250 mL.
- Diluir em aproximadamente 50 mL de etanol, com o auxílio de placa quente e agitação magnética.
- Aguardar esfriar e transferir para um balão volumétrico de 250 mL com aproximadamente 150 mL de etanol.
- Completar o volume com etanol à temperatura de ± 16 °C (refrigerar o etanol e a solução na geladeira antes de completar o volume).

Solução reagente de Folin-Denis

- Adicionar 190 mL de água destilada em um balão de fundo chato.
- Acrescentar 25 g de tungstato de sódio, 5 g de ácido fosfomolibídico e 12,5 mL de ácido fosfórico.
- Colocar a solução em refluxo por 2 horas e, após esse tempo, retirar do refluxo.
- Resfriar a solução e transferir para um balão volumétrico de 250 mL.
- Completar o volume com água destilada.

Solução de carbonato de sódio saturada 35%

- Pesar 175 g de carbonato de sódio anidro em um béquer de 1.000 mL.
- Medir 500 mL de água destilada em proveta e transferir para o béquer para dissolver o carbonato com o auxílio de placa aquecedora com agitação magnética à temperatura de 70 °C a 80 °C.
- Armazenar a solução em um frasco plástico.

Construção da curva padrão para determinação de fenóis

- Pipetar, em quatro tubos de ensaio de 20 mL, 0,8 mL de solução de Folin-Denis, alíquotas de água destilada e de solução padrão de quercetina a 200 µg/mL, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes de reagentes para curva padrão de fenóis com solução padrão de quercetina (200 µG/ML).

Folin-Denis (mL)	Água (mL)	Padrão de Quercetina (mL)	Carbonato de sódio (mL)	Volume final do tubo (mL)	Concentração (µg/mL)	Tubos
0,8	8,4	0,0	0,8	10	0,0	Branco
0,8	8,3	0,1	0,8	10	2,0	Tubo 1
0,8	8,2	0,2	0,8	10	4,0	Tubo 2
0,8	8,1	0,3	0,8	10	6,0	Tubo 3
0,8	8,0	0,4	0,8	10	8,0	Tubo 4

Obs: Curva padrão de fenóis com concentração de 2,0 µL a 8,0 µL

- Agitar por alguns segundos e, no intervalo de 1 a 8 minutos, acrescentar 0,8 mL da solução de carbonato de sódio saturada.
- Deixar em repouso por 30 minutos.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.
- Preparar um branco adicionando todos os reagentes menos a solução padrão de quercetina.

Extrato etanólico de própolis por Soxhlet: obtido conforme descrito no item anterior.

Determinação de compostos fenólicos no extrato etanólico de própolis

- Transferir uma alíquota de 0,4 mL do extrato etanólico livre de cera para três tubos de ensaio de 20 mL, que contenham 8,0 mL de água destilada.
- Acrescentar 0,8 mL da solução de Folin-Denis.
- Agitar por alguns segundos e, no intervalo de 1 a 8 minutos, acrescentar 0,8 mL de solução de carbonato de sódio saturada.
- Completar o volume final para 10 mL com água destilada e agitar.

- Fazer a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.
- Utilizar o mesmo branco da curva padrão para zerar o aparelho.
- Calcular o teor de compostos fenólicos na amostra de própolis conforme a equação abaixo:

$$\text{Compostos fenólicos em } \frac{g}{100g} = \frac{W.Vs}{m.Va} \times 0,1$$

Em que:

W = mg de compostos fenólicos na alíquota, obtido da curva de calibração

Vs = volume da solução estoque em mL

Va = volume da alíquota em mL

m = massa da amostra em g

0,1 = fator de conversão de g/kg para g/100 g

(W = coeficiente angular da curva de calibração x Absorbância da amostra - variável independente da curva)

Determinação do teor de flavonoides

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais analisados da própolis (Menezes, 2005). O teor de flavonoides é considerado um índice importante na avaliação da qualidade da própolis em virtude das atividades biológicas dessa classe de compostos, que são considerados os mais abundantes e efetivos antioxidantes de alguns tipos de própolis, (Menezes, 2005; Lustosa et al., 2008; Melo et al., 2012).

O conteúdo de flavonoides, assim como a atividade bioativa da própolis, pode variar com a origem botânica, o local e a época de coleta (Castro et al., 2007; Melo et al., 2012). Pela legislação brasileira vigente, o teor de flavonoides estabelecido em própolis destinada aos comércios nacional ou internacional deve ser no mínimo de 0,5% (m/m) (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na análise de flavonoides em amostras de própolis por meio de colorimetria, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível, com leituras na faixa do visível a 425 nm, e o uso de quercetina como padrão. A quantificação do teor de flavonoides totais é realizada por espectrofotometria, utilizando-se cloreto de alumínio como reagente de deslocamento. Baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com os flavonoides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas (Woisky,1996; Marcucci et al., 1998; Woisky; Salatino, 1998). O conteúdo total de flavonoides é expresso em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato de própolis.

Materiais

- Balões volumétricos de 50 mL, 250 mL, 500 mL e 1.000 mL
- Béquer de 100 mL, 250 mL, 500 mL e 1.000 mL
- Cartucho extrator
- Conjunto de extrator Soxhlet
- Cronômetro
- Cubeta de quartzo
- Dessecador
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Funil
- Kitasato
- Lenço de papel
- Mangueira de silicone
- Papel-filtro
- Pérolas de vidro
- Piceta
- Pinça
- Pipetas automáticas (1,0 mL a 10,0 mL)
- Proveta de 200 mL
- Vidro de relógio

Equipamentos

- Balança analítica
- Bomba de vácuo
- Capela
- Espectrofotômetro UV-Visível
- Freezer
- Placa aquecedora
- Refrigerador

Reagentes

- Água destilada
- Cloreto de alumínio
- Etanol
- Quercetina

Procedimento

Preparo de soluções:

Solução padrão de quercetina (200 µg/mL)

- Pesar 0,05 g de quercetina em um béquer de 250 mL e diluir com aproximadamente 50 mL de etanol, com o auxílio de placa quente e agitação magnética.
- Aguardar esfriar e transferir para um balão volumétrico de 250 mL com aproximadamente 150 mL de etanol.
- Completar o volume com etanol à temperatura de ± 16 °C (refrigerar o etanol e a solução antes de completar o volume).

Solução de cloreto de alumínio a 5%

- Pesar 12,5 g de cloreto de alumínio em um béquer de 250 mL.

- Diluir com aproximadamente 200 mL de etanol e transferir para um balão de 250 mL.
- Completar o volume com etanol.

Construção da curva padrão para determinação de flavonoides em própolis

- Pipetar, em quatro tubos de ensaio, 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 5%, alíquotas de etanol PA e de solução padrão de quercetina a 200 $\mu\text{g/mL}$, conforme Tabela 3.
- Agitar por alguns segundos.
- Deixar em repouso por 30 minutos.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro a 425 nm.
- Preparar um branco adicionando todos os reagentes menos a solução padrão de quercetina.
- Construir a curva em planilha eletrônica com determinação da equação da curva e do r^2 .

Tabela 3. Volumes de reagentes para curva padrão de flavonoides* com solução padrão de Quercetina (200 $\mu\text{g/mL}$)* Curva padrão de flavonoides de 4 μL a 12 μL

Etanol (mL)	Padrão de quercetina (mL)	Sol. cloreto de alumínio (mL)	Volume final do tubo (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Tubos
9,0	0,0	1,0	10	0,0	Branco
8,8	0,2	1,0	10	4,0	Tubo 1
8,7	0,3	1,0	10	6,0	Tubo 2
8,6	0,4	1,0	10	8,0	Tubo 3
8,4	0,6	1,0	10	12,0	Tubo 4

* Curva padrão de flavonoides de 4 μL a 12 μL

Extrato etanólico de própolis por Soxhlet: obtido conforme descrito em item anterior.

Determinação de flavonoides no extrato etanólico de própolis

- Transferir uma alíquota de 4,0 mL do extrato etanólico livre de ceras para tubos de ensaio de 20 mL, que contenham 6,0 mL de etanol.
- Acrescentar 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio a 5%. Agitar por alguns segundos.
- Fazer a leitura em espectrofotômetro a 425 nm, após 30 minutos de repouso.
- Utilizar o mesmo branco da curva padrão para zerar o aparelho.
- Realizar o cálculo do teor de flavonoides utilizando a seguinte equação:

$$\text{Flavonoides em } \frac{g}{100 g} = \frac{W \cdot V_s}{m \cdot V_a} \times 0,1$$

Em que:

W = mg de flavonoides na alíquota, obtido da curva de calibração

Vs = volume da solução estoque em mL

Va = volume da alíquota em mL

m = massa da amostra em g

0,1 = fator de conversão de g/kg para g/100 g

(W = Coeficiente angular da curva de calibração x Absorbância da amostra + variável independente da curva)

De acordo com a legislação (Brasil, 2001), a própolis é classificada quanto ao teor de flavonoides em:

- Baixo teor: até 1,0% (m/m).
- Médio teor: >1,0% - 2,0% (m/m).
- Alto teor: >2,0% (m/m).

Determinação da atividade de oxidação (índice de oxidação)

O índice de oxidação sofre variações quanto ao período pós-colheita e às condições de armazenamento da própolis, cujos longos períodos de armazenamento em condições de elevada temperatura provocam aumento desse parâmetro, com efeitos sobre sua atividade biológica (Asis, 1989; Melo et al., 2012). Em decorrência disso, a legislação limita o índice de oxidação em até 22 segundos (Brasil, 2001). Observa-se estreita relação entre o índice de oxidação e os teores de compostos fenólicos e flavonoides, especialmente em alguns tipos de própolis, como a própolis verde (Bastos et al., 2011).

Princípio do método: Fundamenta-se na determinação do índice de oxidação em amostras de própolis por meio do uso de permanganato de potássio como agente oxidante dos fenóis e flavonoides presentes na amostra (Melo et al., 2012). A análise é feita em duplicata e o resultado é expresso pelas médias dos tempos de desaparecimento da cor rosa, registrados em segundos.

Materiais

- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Béquer de 100 mL e 250 mL
- Cadinho de Gooch
- Cronômetro
- Frasco Duran âmbar de 250 mL
- Funil
- Kitasato
- Mangueira de silicone
- Papel-filtro
- Piceta

- Pipetas automáticas (1,0 mL a 10,0 mL)
- Proveta 200 mL

Equipamentos

- Balança analítica
- Bomba de vácuo
- Capela de exaustão
- Estufa
- Placa aquecedora

Reagentes

- Água destilada
- Ácido sulfúrico
- Etanol
- Oxalato de sódio
- Permanganato de potássio

Preparo de soluções (Segundo procedimentos descritos em Morita; Assumpção, 2007):

Solução de permanganato de potássio 0,1 N (KMnO_4)

- Pesar 3,2 g de permanganato de potássio em um béquer.
- Diluir com aproximadamente 100 mL de água destilada.
- Transferir para um balão de 1.000 mL e completar o volume.
- Transferir a solução para um béquer e aquecê-la entre 60 °C e 70 °C por 2 horas (placa quente ou banho-maria).
- Filtrar a solução para remover a parte insolúvel por meio de um cadinho de Gooch que contenha polpa de amianto, para não decompor o KMnO_4 .
- Armazenar em frasco âmbar e em ausência de luz.
- Padronizar a solução a cada 2 meses de uso.

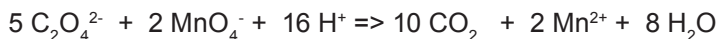
Solução padrão de 0,05 mol/L de oxalato de sódio

- Pesar em um béquer de 250 mL exatamente 6,701 g de oxalato de sódio, previamente dessecado em estufa a 110 °C por 2 horas.
- Adicionar 100 mL de água destilada quente.
- Agitar para dissolver e aguardar o resfriamento.
- Transferir para um balão de 1.000 mL e completar o volume.

Observação: Não armazenar a solução em frasco de vidro.

Padronização de KMnO_4 0,1 N com oxalato de sódio

- Pipetar 20 mL da solução de oxalato de sódio 0,05 mol/L e transferir para um erlenmeyer de 250 mL de capacidade.
- Acrescentar \pm 20 mL de água destilada e 4 mL de H_2SO_4 PA.
- Aquecer a solução entre 70 °C e 80 °C.
- Titular a quente com a solução de KMnO_4 , em constante agitação, até que a solução titulada se torne levemente rosa.
- Observar se a cor persiste por mais de 30 segundos. A temperatura da solução deve permanecer acima de 60 °C até o final da titulação.
- Fazer um branco usando a mesma quantidade de água e 4 mL de H_2SO_4 PA, nas mesmas condições de temperatura na titulação com a solução de KMnO_4 .
- Calcular a concentração de KMnO_4 em mol/L subtraindo-se o volume usado (mL) da solução de KMnO_4 na titulação da prova em branco do volume usado na padronização com o oxalato de sódio.
- A reação é representada pela seguinte equação:



Procedimento

- Pipetar 4 mL do extrato de própolis em um béquer de 100 mL.
- Adicionar 46 mL de água destilada (solução 0,2%) e agitar com um bastão de vidro.
- Pipetar 1,0 mL da solução de própolis diluída e acrescentar 40 mL de água destilada em um béquer de 100 mL.
- Acrescentar 1,0 mL de H_2SO_4 a 20%, misturar bem e resfriar em banho de gelo com temperatura entre 18 °C e 20 °C.
- Acrescentar 5 μ L de $KMnO_4$ 0,1N .
- Cronometrar e anotar o tempo até o desaparecimento da cor rosa contra um fundo branco.

Determinação de resíduo seco (solúveis em etanol)

Resíduo seco ou extrato seco é o parâmetro que quantifica a porcentagem de sólidos solúveis extraídos da própolis por um determinado solvente (Funari; Ferro, 2006; Bastos et al., 2011). Uma vez que reflete a quantidade de resinas bioativas extraíveis pelo solvente (Sawaya et al., 2011), esse parâmetro pode estar relacionado aos teores de compostos fenólicos e flavonoides e ao índice de oxidação (Silva et al., 2006; Bastos et al., 2011) e apresenta variações de acordo com o local e com o período de coleta da própolis (Sousa et al., 2007). A legislação brasileira determina que o teor de sólidos solúveis em etanol em amostras de própolis deve ser, no mínimo, 35% (m/m) (Brasil, 2001).

Princípio do método: Fundamenta-se na secagem de uma alíquota definida do extrato etanólico de própolis livre de cera, a uma temperatura de 105 °C em estufa, até peso constante. O teor de sólidos solúveis em etanol é expresso em porcentagem (Funari; Ferro, 2006; Matsuda, 2006).

Materiais

- Cápsulas
- Dessecador
- Garra
- Pipeta volumétrica

Equipamentos

- Balança analítica
- Estufa

Procedimento

- Colocar três cápsulas identificadas a lápis no fundo, ajustar a estufa para 105 °C e deixar por, no mínimo, 1 hora após a temperatura ser atingida.
- Desligar a estufa e tirar as cápsulas com uma garra, colocar no dessecador e aguardar esfriar.
- Pesar em balança analítica (Ps1).
- Pipetar uma alíquota de 5 mL do extrato de própolis livre de cera em cada uma das cápsulas.
- Levar à estufa a 105 °C por 2 horas.
- Retirar a amostra com o auxílio de uma garra, colocar no dessecador e aguardar esfriar.
- Pesar em balança analítica (Ps2); repetir a operação até peso constante.
- Calcular o teor de sólidos solúveis em etanol (%) conforme a equação abaixo.

$$\text{Sólidos solúveis (\%)} = \frac{Ps2 - Ps1}{W} \times 100$$

Em que:

Ps1 = peso inicial da cápsula

Ps2 = peso final da cápsula

W= peso da amostra de própolis bruta, correspondente à alíquota de 5 mL do extrato

Referências

AGUIAR, G. R.; LEMOS, T. L. G. de; DORNELAS, C. A.; SILVA, A. M. da; ALMEIDA, M. C. S. de; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, I. R. de; NASCIMENTO, P. G. G. do. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, p. 2-12, 2018.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997a. v. 1, cap. 4.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997b. v. 2, cap. 26.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 16th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1995. cap. 4.1.03.

ASIS, M. **Propóleo**: el oro púrpura de las abejas. La Havana: Cento de Información Documentación Agropecuária, 1989. 255 p.

BASTOS, E. M.; OLIVEIRA, V. D. C.; SOARES, A. E. E. Microscopic characterization of the green própolis, produced in Minas Gerais state, Brazil. **Honeybee Science**, v. 21, n. 4, p. 179-180, 2000.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BASTOS, E. M. A. F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M.; SCOARIS, D. O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 jan. 2001. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/artesanaisetradicionais/assets/files/documento%201%20%20instrucao%20normativa%20sda%20n%2003%20de%2019012001.pdf>. Acesso em: 23 out. 2020.

BREYER, H. F. E.; BREYER, E. D. H.; CELLA, I. **Produção e beneficiamento da própolis**. Florianópolis: Epagri, 2016. 31p. (Boletim didático, 138). Disponível em: <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BD/article/view/405/301>. Acesso em: 23 out. 2020.

BRIGHENTI, D. M.; SANTOS, F. C. dos; BRIGHENTI, C. R. G. Método para intensificar a produção de própolis: o quadro coletor "Tira e Põe". **Mensagem Doce**, n. 85, p. 2-6, mar. 2006.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. de; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CITÓ, A. M. G. L.; SILVA, M. S. S.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A.; SOUZA, D. C. Própolis de Teresina, PI: constituintes químicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Confederação Brasileira de Apicultura, 2004. 1 CD-ROM.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191 p.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New propolis type from northeast Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017.

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. F. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, n. 1, p. 1-10, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análises de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GHISALBERTI, V. Q. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

LOPEZ, B. G. **Análise química dos compostos bioativos da própolis vermelha**. Campinas. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MARCUCCI, M. C. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 2, p. 115-123, 1999.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; CUSTÓRIO, A. R. Mapeamento químico de própolis das regiões Sul e Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Confederação Brasileira de Apicultura, 2000. 1 CD-ROM.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA V.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, n. 3, p. 234-239, 1998. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>. Acesso em: 13 nov. 2019.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 540-548, 2012.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**: padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2007. 626 p.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M. ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D., CASSINI, S. T.; PEREIRA, C. S; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Resource and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRÍCIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 2000.

RIGHI, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, W. E.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SANTANA, A. G. **Produção de própolis por *Apis mellifera* L. (africanizadas) e avaliação do uso do pólen na determinação de sua origem botânica**. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SANTOS, M. A. dos. **Estudo do forrageamento de própolis em abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L. 1758**. 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. da S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 27, p. 1-10, 2011.

SEBRAE-BA. **Agronegócios**: produção de própolis. Salvador, 2017. Disponível em: [https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal Sebrae/UFs/BA/Anexos/Produção de própolis na Bahia.pdf](https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/Produção%20de%20própolis%20na%20Bahia.pdf). Acesso em: 13 nov. 2019.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGALI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. A. da; RODRIGUES, A. E.; MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, nov./dez. 2006.

SOARES, A. E. E. Uso de resinas pelas abelhas e fatores que alteram a produção de própolis. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Biodiversidade e uso sustentado de abelhas**: anais. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. p. 387-391.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

TORRES, R. N. S.; LOPES, J. A. D.; MOITA NETO, J. M.; CITÓ, A. M. G. L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 479-485, 2008.

WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

Embrapa

Meio-Norte

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL