

# ***Harmonização de metodologias de análise da própolis***

## ***Harmonization of standard procedures for propolis analysis***

Mélissa Lopes, Luís F. Nunes, Soraia I. Falcão e Miguel Vilas-Boas

### **Revista de Ciências Agrárias**

Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal

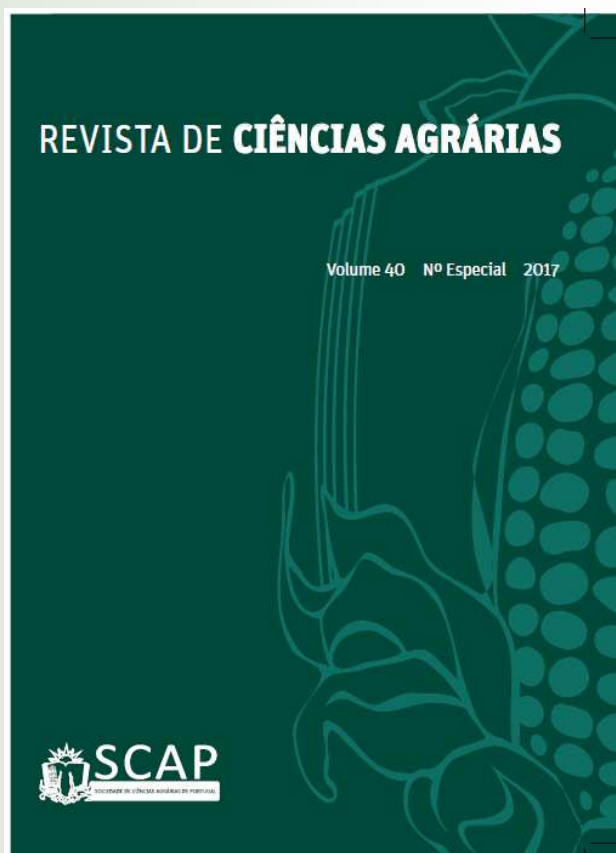
ISSN 0871-018 X (impressão/print)

ISSN 2183-041X (Online)

Volume 40, Nr. ESPECIAL (2017)

Rev. Ciênc. Agr. (2017), vol. 40, n. sp, p. 208-215

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16225>



# Harmonização de metodologias de análise da própolis

## Harmonization of standard procedures for propolis analysis

Mélissa Lopes, Luís F. Nunes, Soraia I. Falcão e Miguel Vilas-Boas\*

*Centro de Investigação da Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal*

(\*E-mail: mvboas@ipb.pt)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16225>

Recebido/received: 2016.12.22

Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.03.20

Aceite/accepted: 2017.03.21

### RESUMO

A própolis é um produto da colmeia resinoso utilizado pelo homem desde dos tempos antigos e explorado pelas suas propriedades farmacológicas. A variabilidade da sua composição química, associada com a diversidade floral de onde provém, requer a análise de diversos parâmetros de qualidade. Ao nível Europeu, para além da inexistência de regulamentação que defina esses parâmetros de qualidade, tão pouco se encontram estabelecidas as metodologias de análise deste produto, observando-se uma variedade de métodos descritos na literatura, muitas das vezes não comparáveis.

A *International Honey Commission* (IHC), uma rede mundial que visa o desenvolvimento de novos e eficazes processos analíticos de controlo da qualidade dos produtos apícolas bem como a definição de critérios de qualidade, através do seu grupo de trabalho da própolis, definiu como prioritário a harmonização das metodologias de análise da qualidade da própolis, particularmente o teor em cinzas, teor em ceras (utilizando duas metodologias alternativas), conteúdo balsâmico após extração por ultrassons ou agitação mecânica, bem como a análise da sua componente fenólica através da quantificação de fenóis totais, flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis. Neste projeto colaborativo, participaram 15 entidades, incluindo 14 laboratórios e uma empresa internacional de laboração de própolis.

Os resultados obtidos no laboratório da Escola Superior Agrária de Bragança permitem-nos efetuar uma primeira abordagem da aplicação dos protocolos, concluindo-se da sua fácil implementação, com exceção da avaliação do conteúdo em ceras, para o qual o procedimento se mostrou laborioso e de implementação mais limitada em análises de rotina. Comparando os dois métodos de análise de ceras, os valores obtidos demonstraram concordância, independentemente do teor de cera nas amostras.

Relativamente ao procedimento de extração (conteúdo balsâmico), as amostras revelaram valores compreendidos entre 43% e 70%, independentemente do recurso à agitação mecânica ou ultrassons, o que revela a vantagem deste segundo método, considerando a redução significativa do tempo utilizado.

De uma forma geral, os resultados obtidos através dos métodos testados para os diferentes parâmetros, para além de oscilarem de acordo com a sua origem botânica, demonstram um desempenho constante independentemente da grandeza do valor absoluto.

**Palavras-chave:** Própolis, harmonização de metodologias, Comissão Internacional do Mel, estudo colaborativo.

### ABSTRACT

Propolis (bee glue) is a resinous bee hive product used by man since ancient times due to its pharmaceutical properties. The variability of its chemical composition, linked with the floral origin, requires the analysis of several quality parameters. Nevertheless, at the European level, in addition to the inexistence of legal requirements for quality control, there is also a lack of analytical procedures, despite the presence in the literature of several methodologies, which are often not comparable.

The International Honey Commission, an worldwide network aiming to implement and develop new analytical methods for the control bee products and the establishment of quality standards, defined as a priority, within the propolis working group, the harmonization of analytical procedures for propolis quality evaluation, particularly in respect to ash, wax (using two alternative methods), balsamic content after extraction with ultrasonic or mechanical agitation as well as the analysis of its phenolic composition through the assessment of total phenolics, flavones/flavonols and flavanones/

di-hydroflavonols. This collaborative study was engaged by 15 entities, including 14 laboratories and an international company working with propolis.

According to the results obtained in our laboratory it is possible to draw a first evaluation on the applied methods, in particular the simplicity on the protocol implementation, with exception for the wax content, which proved to be laborious and non-adapted for routine analysis. Nevertheless, the wax values from both methodologies seems to agree, independently of its level in the samples.

For the extraction procedure (balsamic content), the samples showed values between 43% and 70%, independent of the use of mechanical stirring or sonication, which shows the advantage of this second method, which enables a significant reduction in labor time, regardless of the absolute value.

Overall, the results found for the tested protocols, for the different parameters, revealed a constant performance, besides de natural oscillation associated with the floral origin.

**Keywords:** Propolis, harmonization of methodologies, International Honey Commission, collaborative study.

## INTRODUÇÃO

A própolis é um material viscoso elaborado pelas abelhas, usado como material de construção para selar as fissuras da colmeia, mas também para controlar a contaminação biológica na colônia (Zhang *et al.*, 2014). As abelhas preparam esta substância recolhendo com as suas mandíbulas os exsudatos resinosos de rebentos, folhas, flores, frutos, galhos e cascas de diferentes plantas presentes nas proximidades da colmeia, às quais adicionam, já no interior da colmeia, cera e secreções salivares, a fim de produzir a própolis (Falcão *et al.*, 2013a). Esta mistura apresenta um cheiro agradável e uma cor que pode variar entre o creme, amarelo, verde, vermelha, castanho ou quase preto, dependendo muito da planta de onde provém a resina e da sua conservação. Algumas amostras têm uma textura friável, dura, enquanto outras exibem uma textura elástica e pegajosa.

Nas regiões temperadas, onde os rebentos de choupo são a principal fonte para resina, a própolis apresenta uma composição rica em ácidos fenólicos e flavonóides simples, bem como derivados metilados e/ou esterificados (Falcão *et al.*, 2010 e 2013a, b). Nas regiões tropicais, onde os choupos não são abundantes, as abelhas procuram outras fontes florais alternativas para a produção da resina. A própolis de regiões tropicais, em particular a própolis verde Brasileira, é objeto de muitos estudos científicos devido à sua atividade biológica elevada, com uma composição rica em derivados prenizados do ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos (Kumazawa

*et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2017). O teor de compostos fenólicos vai-se refletir na sua elevada bioatividade cuja variabilidade está relacionada com a sua origem fitogeográfica (Bankova, 2005; Falcão *et al.*, 2014; Kujungiev *et al.*, 1999).

A recolha da própolis na colmeia é realizada através da raspagem da resina colocada pelas abelhas sobre as paredes da colmeia para fixação dos quadros ou através da colocação de redes específicas no interior da colmeia. Estas redes possuem orifícios com diâmetros específicos, os quais induzem as abelhas à sua selagem com própolis, podendo assim ser recolhido pelo apicultor. As épocas de maior produção ocorrem na primavera e no outono, associado com as fases de maior desenvolvimento da colônia e com a preparação para o inverno.

A variabilidade química desta mistura é muito elevada, e por esta razão é frequentemente necessário avaliar a sua composição para aferir o seu valor comercial (Falcão *et al.*, 2013c). Deste modo, e para permitir a comparabilidade entre amostras, é importante utilizar metodologias analíticas padronizadas. Este projeto tem como objetivo definir internacionalmente metodologias para avaliação de alguns parâmetros físico-químicos, com base num estudo colaborativo realizado pelo grupo de trabalho da própolis da *International Honey Commission*, IHC. Neste âmbito, participaram no ensaio 15 entidades de 11 países diferentes, envolvendo 14 laboratórios de controlo de qualidade de produtos da colmeia e uma empresa internacional com interesses na laboração de própolis. A sua

participação no ensaio focou-se na disponibilização de amostras, mas essencialmente na recolha e homogeneização das diferentes própolis a ensaiar, bem como o seu seccionamento, codificação e distribuição pelos laboratórios participantes.

Os parâmetros/métodos analíticos, objeto de harmonização, definidos previamente no âmbito da última reunião do grupo própolis da IHC decorrida na Croácia em 2014, foram os seguintes: teor em cinzas, teor de ceras, conteúdo balsâmico (extração de compostos fenólicos), fenóis totais, flavonas/flavonóis e flavanonas/ di-hidroflavonóis.

A definição dos protocolos a aplicar foi baseada num levantamento prévio dos procedimentos usados em cada um dos laboratórios, os quais após discussão entre os participantes, permitiu definir um conjunto de protocolos finais a aplicar por todos os participantes. Para alguns parâmetros foram estabelecidos protocolos alternativos, os quais serão alvo de análise e comparação de modo a estabelecer o método harmonizado. A execução de todos os métodos e das alternativas foi facultativa, dependendo das disponibilidades de equipamento dos diferentes laboratórios.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostragem*

Para o trabalho foram avaliadas 15 amostras de própolis, de origem diversa, disponibilizadas pelos participantes. As amostras foram recolhidas por uma das entidades participantes, a qual aplicou, individualmente a cada amostra, um processo de trituração e homogeneização, seccionando o seu conteúdo em 14 alíquotas. Cada laboratório participante no ensaio recebeu uma alíquota de cada amostra, devidamente codificada, a qual foi armazenada a -20°C até posterior análise.

### *Cinzas*

Para a avaliação do teor de cinzas efetuou-se uma incineração de 1 g de própolis (A2) numa mufla a 600°C durante 3 h, até obter cinzas de cor branca ou cinzenta. Após a incineração colocou-se o cadinho, previamente pesado (A1), em arrefecimento num

exsiccador, determinando-se de seguida a sua massa. Posteriormente aplicou-se uma incineração adicional de 30 minutos, repetindo-se o procedimento até obter um peso constante (A3). A quantidade de cinzas é expressa em % e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Cinzas} = [(A3-A1)/(A2)] \times 100$$

### *Ceras*

Para a determinação do teor de ceras foram testados dois protocolos diferentes, possuindo cada um deles duas fases complementares. Para a realização do primeiro procedimento utilizou-se um sistema de Soxhlet, extraíndo-se 2 g de própolis (W1) com éter de petróleo durante 6 h, levando-se o extrato à secura até peso constante (W2).

Para o segundo procedimento aplicou-se um processo de extração por ultrassons, colocando-se 2 g de própolis (W1) em 100 mL de éter de petróleo, durante 30 minutos. Após este período, arrefeceu-se a solução e filtrou-se, levando-se o filtrado à secura até peso constante (W2). A quantidade de ceras em ambos os casos é expressa em % e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Wax1} = (W2/W1) \times 100$$

Para ambos os protocolos anteriormente descritos foi aplicado um procedimento complementar, com o objetivo de remover do extrato etéreo substâncias pouco polares. Com este objetivo adicionou-se ao resíduo seco obtido na primeira fase, 80 mL de metanol, levando-se a mistura à ebulição até se obter uma solução límpida com um resíduo oleoso no fundo do balão, o qual solidifica com o arrefecimento. Em seguida, com a solução quente, filtrou-se a fase metanólica através de um papel de filtro previamente pesado (P1) para um matraz (M1), arrefecendo o matraz a 0°C, e filtrando o seu conteúdo através do mesmo papel de filtro. Após a secagem ao ar, o frasco e o papel de filtro com o resíduo são transferidos para um exsiccador até peso constante (M2 e P2). A quantidade de ceras é expressa em % e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Wax2} = [(F2-F1)+(P2-P1)/W1] \times 100$$

### *Conteúdo Balsâmico (extração fenólica)*

Para a determinação do conteúdo balsâmico foram testados dois métodos alternativos de extração: agitação mecânica e aplicação de ultrassons. Em ambas as situações pesou-se 1 g de própolis e adicionou-se em 30 mL de etanol a 70%. Num dos procedimentos a extração decorreu com agitação mecânica à temperatura ambiente durante 24 h. Após este período a mistura foi filtrada e o sólido re-extraído nas mesmas condições. Para confirmar a ausência de fenóis no sólido adicionou-se uma solução de  $\text{FeCl}_3$  a 5% em metanol, sendo que o não desenvolvimento de cor confirma a ausência destes compostos. Após a última extração, os filtrados são combinados, perfazendo o volume final da solução a 100 mL com etanol a 70%. Para o cálculo do conteúdo balsâmico retira-se uma alíquota do extrato evaporando-se à secura, apresentando os resultados em percentagem. O processo de extração alternativo é semelhante, diferindo apenas na colocação da amostra em banho de ultrassons, durante um período de 20 minutos, em detrimento da agitação mecânica.

### *Composição fenólica total*

A determinação da componente fenólica foi efetuada através da identificação colorimétrica do teor em fenóis totais (método Folin-Ciocalteu) utilizando-se como padrão uma curva de quantificação obtida para o ácido gálico, numa gama de concentrações 0,025 a 0,3  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Inicialmente preparou-se uma solução diluindo 1,5 mL do extrato em 10 mL de solvente. De seguida, retirou-se uma alíquota de 0,2 mL desta solução e misturou-se com 1,5 mL de água e 0,4 mL de reagente de Folin, completando-se o volume com a adição de 0,6 mL de carbonato de sódio a 20% e 2,3 mL de água desionizada, perfazendo um volume final de 5 mL com água desionizada. Após duas horas no escuro avaliou-se a quantidade de compostos fenólicos através da medição da absorvância a 760 nm, exprimindo-se o resultado em % de fenóis (equivalentes de ácido gálico) por grama de própolis. O branco foi preparado nas mesmas condições mas substituindo a quantidade de extrato por idêntica quantidade de solvente.

### *Flavonóides*

O conteúdo em flavonóides foi avaliado através da aplicação do método do cloreto de alumínio para a identificação de flavonas e flavonóis, e pela complexação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP), para a identificação de flavanonas e di-hidroflavonóis.

Para a quantificação de flavonas/flavonóis, preparou-se inicialmente uma solução diluída do extrato através da dissolução de 1,5 mL de extrato balsâmico em 10 mL de solvente (etanol a 70%). Posteriormente preparou-se uma nova solução diluindo 1 mL da solução anterior em 10 mL de solvente e 0,5 mL de  $\text{AlCl}_3$  a 5%, ajustando-se o volume final para 25 mL. Após 30 minutos no escuro, a absorvância foi medida a 425 nm utilizando como branco uma solução preparada nas mesmas condições mas utilizando 1 mL de solvente em substituição da amostra. Os resultados foram expressos em % de flavonas por grama de própolis, utilizando para a quantificação uma reta de calibração de quercetina com concentrações entre 0,005 e 0,250  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Para a quantificação de flavanonas/di-hidroflavonóis preparou-se previamente uma solução diluindo 1 mL de extrato em 2 mL de DNP (1 g de DNP em 2 mL de ácido sulfúrico a 96% numa solução de 100 mL de metanol). De seguida aqueceu-se a solução em banho-maria, com agitação, a 50°C durante 50 minutos. Após arrefecimento, adicionou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução anterior a 10 mL de solvente, completando-se para um volume final de 25 mL. A quantidade de flavanonas/di-hidroflavonóis, expressa em percentagem, foi determinada medindo a absorvância a 486 nm e utilizando-se uma reta de calibração de naringenina com concentrações entre 0,10 e 2,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos para as diferentes amostras, aplicando os protocolos estabelecidos entre os participantes, são apresentados no Quadro 1. Estes resultados permitiram avaliar a dificuldade na aplicação dos diferentes métodos em função das características específicas das amostras de própolis em análise e avaliar a sua aplicabilidade em ensaios de rotina. Adicionalmente foi possível identificar a comparabilidade e adequabilidade dos métodos

para as situações em que foram testados protocolos diferentes. Para a avaliação da reprodutibilidade e repetibilidade dos ensaios será necessário efetuar a comparação dos resultados inter-laboratoriais.

A aplicação do protocolo de avaliação do teor em cinzas revelou ser bastante robusto e simples, obtendo-se para as amostras valores que oscilaram entre os 0,4 e os 3,2%. A repetibilidade destes ensaios é razoável obtendo-se um desvio padrão relativo médio de 5%, o qual varia inversamente com a quantidade de cinzas na amostra.

Para a avaliação do teor de ceras foram testadas as duas opções propostas (extração por Soxhlet ou ultrassons), bem como realizada as duas fases de extração para cada um dos protocolos ensaiados. Os teores em cera obtidos para as amostras apresentam uma grande variabilidade característica de cada amostra, oscilando entre 12 e 44% para a extração de Soxhlet e entre 10 e os 47% para a extração por ultrassons. O mesmo se verificou para a segunda fase, com valores entre 2 e 7%, e 2 e 6% para cada um dos referidos métodos, respetivamente. A precisão dos dois métodos de extração, baseada no desvio padrão relativo das amostras, é

adequada e bastante similar, aproximadamente de 4% para a extração por Soxhlet e 3% para o procedimento por ultrassons. Já no que se refere aos valores absolutos, verifica-se uma grande variabilidade obtendo-se, na primeira fase, diferenças para a mesma amostra que oscilam entre os 11 e 46%. Para a segunda fase, os resultados são também significativamente diferentes com uma variação média entre os métodos de 25%.

Numa primeira análise, e comparando os níveis de cera obtidos por aplicação da primeira e segunda fase de extração das ceras, é evidentemente necessário equacionar a representatividade dos resultados e a sua validade, pois os teores determinados pelas duas fases terão significados físicos distintos. Será importante, neste caso, aferir a composição dos extratos e ponderar se os compostos eliminados com a segunda extração em metanol devem ou não ser considerados no teor total de ceras. Por outro lado, será também de equacionar a aplicabilidade da segunda fase de extração em análises de rotina, dada a complexidade do procedimento. Considerando os dois processos de extração, os resultados exclusivos de um laboratório permitem apenas concluir que os valores obtidos pelos dois processos (Soxhlet

**Quadro 1 -** Conteúdo em cinzas e ceras das 15 amostras de própolis

| Amostra | Teor cinzas (%) | Teor ceras (%)  |           |                    |           |
|---------|-----------------|-----------------|-----------|--------------------|-----------|
|         |                 | Opção 1_Soxhlet |           | Opção 2_ultrassons |           |
|         |                 | Fase 1          | Fase 2    | Fase 1             | Fase 2    |
| S01     | 1,03 ± 0,08     | 22,8 ± 0,5      | 2,8 ± 0,6 | 20,5 ± 0,8         | 3,0 ± 0,6 |
| S02     | 1,29 ± 0,00     | 20,6 ± 0,2      | 2,7 ± 0,1 | 17,1 ± 1,1         | 2,4 ± 0,2 |
| S03     | 1,29 ± 0,06     | 34,3 ± 1,1      | 3,5 ± 0,2 | 27,0 ± 0,4         | 4,4 ± 0,5 |
| S04     | 0,89 ± 0,04     | 27,8 ± 0,6      | 2,8 ± 0,1 | 23,0 ± 0,8         | 3,1 ± 0,8 |
| S05     | 1,61 ± 0,09     | 41,7 ± 3,1      | 8,5 ± 0,8 | 44,4 ± 0,7         | 5,8 ± 0,6 |
| S06     | 3,17 ± 0,01     | 17,4 ± 0,3      | 2,9 ± 0,8 | 11,6 ± 0,2         | 2,8 ± 0,4 |
| S07     | 1,82 ± 0,01     | 25,8 ± 1,3      | 4,0 ± 0,5 | 20,1 ± 0,1         | 3,6 ± 0,6 |
| S08     | 2,34 ± 0,06     | 38,3 ± 1,4      | 3,9 ± 0,5 | 31,2 ± 0,9         | 3,7 ± 0,4 |
| S09     | 1,04 ± 0,08     | 30,8 ± 1,0      | 3,0 ± 0,4 | 30,5 ± 0,5         | 4,3 ± 0,4 |
| S10     | 0,40 ± 0,02     | 11,6 ± 2,0      | 2,0 ± 0,4 | 9,7 ± 0,7          | 1,6 ± 0,3 |
| S11     | 1,61 ± 0,02     | 18,6 ± 0,5      | 3,7 ± 0,6 | 16,9 ± 0,6         | 2,8 ± 0,4 |
| S12     | 1,49 ± 0,09     | 27,9 ± 2,1      | 4,8 ± 0,6 | 24,5 ± 0,0         | 3,2 ± 0,1 |
| S13     | 0,75 ± 0,08     | 19,2 ± 0,7      | 3,8 ± 0,3 | 21,3 ± 0,3         | 2,0 ± 0,2 |
| S14     | 0,36 ± 0,04     | 16,2 ± 0,9      | 3,4 ± 0,7 | 19,7 ± 0,9         | 1,6 ± 0,2 |
| S15     | 0,76 ± 0,03     | 44,4 ± 1,0      | 6,8 ± 0,4 | 46,8 ± 0,1         | 6,2 ± 0,9 |



ou ultrassons), não são equivalentes, dadas as diferenças significativas encontradas entre ambos.

Para a avaliação do conteúdo balsâmico nas amostras de própolis efetuaram-se dois protocolos alternativos: com agitação mecânica à temperatura ambiente e agitação por ultrassons. Em ambas as situações, verificou-se o desenvolvimento de cor com a aplicação de  $\text{FeCl}_3$  a 5% após a primeira extração, pelo que foi necessário repetir o procedimento três vezes, para todas as amostras. Os valores obtidos para o conteúdo balsâmico das amostras de própolis, Quadro 2, variam entre 43 e 70%, para ambos os métodos, com valores de precisão elevados, apresentando um erro relativo médio de 1%. Comparando os valores de cada amostra, obtidos pelos dois métodos, o conteúdo balsâmico é muito semelhante, com uma diferença média relativa de 3 a 4%, podendo-se considerar os métodos equivalentes. Com base nestes resultados, e considerando o decréscimo significativo de tempo de análise sugere-se, como melhor alternativa para análise de rotina, a aplicação do protocolo de extração por ultrassons.

A composição fenólica é um dos parâmetros mais relevantes para a valorização comercial da

própolis, pelo que a utilização de métodos rápidos de avaliação destes compostos é fundamental. Para a quantificação do teor em fenóis foi utilizado a metodologia de Folin-Ciocalteu, obtendo-se valores que oscilaram entre os 6 e os 21%, muito semelhantes (diferenças relativas inferior a 10%) entre os extratos balsâmicos obtidos por agitação mecânica e ultrassons. Esta semelhança foi também verificada para o teor em flavonóides (4% para flavonas/flavonóis e um pouco superior para flavanonas/di-hidroflavonóis, 13%), confirmando uma vez mais a equivalência entre os dois protocolos de extração. O método de Folin-Ciocalteu aplicado nas amostras de própolis de acordo com o protocolo definido apresenta uma boa precisão com um erro relativo inferior a 3%.

A análise de flavonas e flavonóis, apresentou também um bom desempenho, com uma elevada precisão, verificada através de um desvio médio relativo de 1%, para teores observados entre 1 e 9%. Para o conjunto de flavanonas e di-hidroflavonóis, os teores são mais elevados, oscilando entre 7 e 17%. Para este procedimento observou-se uma menor precisão, no entanto com valores para o desvio médio relativo razoáveis e inferiores a 5%.

**Quadro 2 -** Conteúdo em fenóis das 15 amostras de própolis

| Amostra | Conteúdo balsâmico  |                     | Fenóis totais (%)  |                     | Flavonas/Flavonóis (%) |                     | Flavanonas/Di-hidroflavonóis (%) |                     |
|---------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|
|         | Opção 1_ temp. amb. | Opção 2_ ultrassons | Opção 1_ tem. amb. | Opção 2_ ultrassons | Opção 1_ temp. amb.    | Opção 2_ ultrassons | Opção 1_ temp. amb.              | Opção 2_ ultrassons |
| S01     | 63,2 ± 1,1          | 64,1 ± 0,7          | 13,7 ± 0,7         | 14,6 ± 0,0          | 2,45 ± 0,05            | 2,26 ± 0,01         | 11,4 ± 1,1                       | 10,1 ± 0,3          |
| S02     | 67,2 ± 0,8          | 65,8 ± 0,3          | 14,5 ± 0,6         | 16,2 ± 0,5          | 4,90 ± 0,06            | 5,03 ± 0,07         | 14,3 ± 0,1                       | 13,5 ± 0,5          |
| S03     | 52,3 ± 0,3          | 49,6 ± 0,8          | 11,3 ± 0,4         | 12,5 ± 0,3          | 3,32 ± 0,09            | 3,37 ± 0,05         | 10,8 ± 0,6                       | 9,7 ± 0,7           |
| S04     | 58,1 ± 0,8          | 57,8 ± 0,9          | 9,4 ± 0,3          | 11,8 ± 0,2          | 2,43 ± 0,04            | 2,60 ± 0,01         | 10,5 ± 0,8                       | 9,4 ± 0,9           |
| S05     | 42,7 ± 0,9          | 43,1 ± 0,3          | 10,6 ± 0,5         | 12,4 ± 0,2          | 4,10 ± 0,07            | 4,21 ± 0,11         | 9,7 ± 0,7                        | 9,1 ± 0,4           |
| S06     | 53,9 ± 1,3          | 47,0 ± 0,4          | 9,2 ± 0,4          | 10,4 ± 0,1          | 3,23 ± 0,04            | 3,06 ± 0,02         | 8,7 ± 0,4                        | 7,2 ± 0,3           |
| S07     | 50,3 ± 0,7          | 45,0 ± 0,5          | 7,5 ± 0,1          | 6,1 ± 0,7           | 1,56 ± 0,08            | 1,41 ± 0,03         | 12,1 ± 0,8                       | 11,2 ± 0,6          |
| S08     | 56,9 ± 1,2          | 53,0 ± 0,4          | 10,2 ± 0,4         | 9,6 ± 0,4           | 3,01 ± 0,07            | 2,83 ± 0,04         | 7,7 ± 0,5                        | 8,4 ± 0,4           |
| S09     | 61,4 ± 0,1          | 58,5 ± 0,4          | 13,8 ± 0,1         | 15,5 ± 0,4          | 5,71 ± 0,04            | 5,69 ± 0,09         | 9,1 ± 0,1                        | 11,7 ± 0,7          |
| S10     | 67,6 ± 0,8          | 66,6 ± 0,2          | 14,8 ± 0,1         | 14,2 ± 0,9          | 6,46 ± 0,01            | 6,20 ± 0,08         | 11,8 ± 0,9                       | 12,4 ± 0,6          |
| S11     | 66,5 ± 0,6          | 65,3 ± 0,7          | 17,2 ± 0,3         | 16,6 ± 0,8          | 7,15 ± 0,03            | 6,63 ± 0,03         | 13,4 ± 0,5                       | 14,6 ± 0,6          |
| S12     | 60,1 ± 0,5          | 62,1 ± 0,4          | 15,3 ± 0,4         | 14,3 ± 0,4          | 6,11 ± 0,02            | 6,20 ± 0,03         | 10,8 ± 0,3                       | 13,9 ± 0,5          |
| S13     | 65,8 ± 1,0          | 68,1 ± 0,1          | 17,3 ± 0,0         | 16,9 ± 0,1          | 7,01 ± 0,04            | 7,00 ± 0,05         | 12,4 ± 0,9                       | 15,5 ± 0,1          |
| S14     | 69,9 ± 0,3          | 70,1 ± 0,7          | 20,6 ± 0,2         | 19,3 ± 0,5          | 8,61 ± 0,01            | 8,43 ± 0,01         | 15,1 ± 0,0                       | 16,6 ± 0,8          |
| S15     | 51,1 ± 0,8          | 51,1 ± 0,2          | 12,8 ± 0,4         | 12,5 ± 0,3          | 3,89 ± 0,09            | 3,95 ± 0,03         | 9,2 ± 0,6                        | 11,4 ± 0,6          |

## CONCLUSÕES

Os protocolos definidos através do ensaio colaborativo da *International Honey Commission* para a análise de própolis demonstraram ser de implementação simples, com exceção da avaliação do conteúdo em ceras, o qual se mostrou laborioso e de implementação mais condicionada para análises de rotina. Este procedimento foi também o que demonstrou pior desempenho em termos de precisão dos resultados, reforçando a necessidade de melhorar o protocolo, bem como identificar a composição dos extratos obtidos sem e com extração metanólica.

Para os restantes métodos, a precisão dos resultados é elevada, não demonstrando sensibilidade específica às características e teores das amostras de própolis.

Relativamente ao procedimento de extração (conteúdo balsâmico), verificou-se uma semelhança

elevada nos resultados independentemente da aplicação de agitação mecânica ou ultrassons, quer ao nível do teor global, quer na quantidade específica de fenóis ou flavonóides. A concordância entre estes dois métodos permite sugerir como a alternativa mais adequada, a aplicação de ultrassons em análises de rotina, particularmente pela vantagem de uma redução significativa do tempo utilizado.

Futuramente será necessário analisar e comparar os resultados obtidos nos restantes laboratórios e efetuar uma avaliação estatística das metodologias, de forma a introduzir quaisquer alterações aos procedimentos e propor as metodologias harmonizadas para análise de própolis.

## AGRADECIMENTOS

Ao grupo de trabalho da própolis da *International Honey Commission*, IHC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bankova, V. (2005) – Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2, n. 1, p. 29-32. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh059>
- Coelho, J.; Falcão, S.I.; Vale, N.; Almeida-Muradian, L.B. & Vilas-Boas, M. (2017) – Phenolic composition and antioxidant activity assessment of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Apicultural Research*, vol. 56, n. 1, p. 21-31. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1277602>
- Falcão, S.; Vilas-Boas, M.; Estevinho, L.M.; Barros, C.; Domingues, M.R.M. & Cardoso, S.M. (2010) – Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, n. 2, p. 887-897. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8>
- Falcão, S.I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M.R.M.; Freire, C.; Cardoso, M. & Vilas-Boas, M. (2013a) – Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, vol. 24, n. 4, p. 309-318. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2412>
- Falcão, S.I.; Tomás, A.; Vale, N.; Gomes, P.; Freire, C. & Vilas-Boas, M. (2013b) – Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, vol. 49, p. 805-812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.021>
- Falcão, S.I.; Freire, C. & Vilas-Boas, M. (2013c) – A proposal for quality standards and antioxidant activity of Portuguese propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 90, n. 11, p. 1729-1741. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2324-y>
- Falcão, S.I.; Vale, N.; Cos, P.; Gomes, P.; Freire, C.; Maes, L. & Vilas-Boas, M. (2014) – In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytoterapy Research*, vol. 28, n. 3, p. 437-443. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5013>
- 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*, vol. 64, n. 3, p. 235-240. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7)



- Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T. & Nakayama, T. (2003) – Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 51, n. 6, p. 740-742. <http://doi.org/10.1248/cpb.51.740>
- Zhang, T.; Omar, R.; Siheri, W.; Al-Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Edrada-Ebel, R.A. & Watson, D. (2014) – Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta*, vol. 120, p. 181-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.094>