

## Artigo

**Desenvolvimento e Avaliação de Metodologia Analítica para Determinação de Micronutrientes (Na, K, Mg e Ca) em Amostras de Própolis *in natura* Empregando HR-CS FAAS****Guida, M. A. B.; Barbosa, J. T. P.; Torres, E. A.; Fernandes, A. P.; Santos, J. C. C.;\* Korn, M. G. A.\****Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (6), 1792-1804. Data de publicação na Web: 21 de dezembro de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**Development and Evaluation of Analytical Method for Micronutrients (Na, K, Ca and Mg) Determination *in natura* Propolis Samples by HR-CS FAAS**

**Abstract:** Propolis is a complex mixture of substances collected by honeybees from exudates of plants, beeswax and pollen. The main purpose this study was the development of analytical method for micronutrients determination *in natura* propolis by HR-CS FAAS after microwave-assisted acid digestion. The accuracy of the method was demonstrated using certified reference material, recovery assay and comparison with ICP OES results. A *t*-test showed good agreement at 95% confidence level for certified reference material. The optimized procedure led to recoveries around 86-110%. The analytical procedure was applied in 48 samples collected around Bahia State (Brazil) showing viability of using HR-CS FAAS technique for quantifying micronutrients in complex samples.

**Keywords:** *in natura* propolis; micronutrients; HR-CS FAAS.

**Resumo**

Própolis é uma mistura complexa de substâncias colhidas por abelhas presentes em exsudados de plantas, cera e pólen. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico para determinação de micronutrientes em amostras de própolis *in natura* empregando HR-CS FAAS após digestão assistida por radiação micro-ondas. A exatidão do método foi demonstrada através do uso de material de referência certificado, ensaio de recuperação e comparação dos resultados obtidos com ICP OES. O teste *t* apresentou concordância a um nível de 95% para os resultados com material de referência certificado. O procedimento otimizado propiciou recuperação na faixa de 86 a 110% dos analitos. O procedimento analítico otimizado foi aplicado em 48 amostras coletadas no estado da Bahia (Brasil) mostrando viabilidade do emprego da técnica de HR-CS FAAS para quantificação de micronutrientes em amostras complexas.

**Palavras-chave:** Própolis *in natura*; micronutrientes; HR-CS FAAS.

\* Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus de Ondina, Ondina, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

✉ [korn@ufba.br](mailto:korn@ufba.br)

\* Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-900, Maceió-AL, Brasil.

✉ [jcarinhanha@yahoo.com.br](mailto:jcarinhanha@yahoo.com.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20160120](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160120)

## **Desenvolvimento e Avaliação de Metodologia Analítica para Determinação de Micronutrientes (Na, K, Mg e Ca) em Amostras de Própolis *in natura* Empregando HR-CS FAAS**

**Mauro Agildo B. Guida,<sup>a,†</sup> José Tiago P. Barbosa,<sup>a,b</sup> Ednildo A. Torres,<sup>c</sup> Andréa Pires Fernandes,<sup>d</sup> Josué Carinhanha Caldas Santos,<sup>d</sup> Maria das Graças A. Korn<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Campus de Ondina, Ondina, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Rua Glicério Tavares, Bate Quente, CEP 45400-000, Valença-BA, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, Campus de Ondina, Ondina, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-900, Maceió-AL, Brasil.

\* [korn@ufba.br](mailto:korn@ufba.br); [jcarinhanha@yahoo.com.br](mailto:jcarinhanha@yahoo.com.br)

*Recebido em 30 de agosto de 2015. Aceito para publicação em 19 de dezembro de 2016*

### **1. Introdução**

### **2. Experimental**

**2.1.** Reagentes e soluções

**2.2.** Instrumentação

**2.3.** Amostras

**2.4.** Procedimento de digestão assistida por micro-ondas

**2.5.** Determinação da acidez final dos digeridos

**2.6.** Determinação do teor de carbono residual dos digeridos

**2.7.** Avaliação da exatidão

### **3. Resultados e discussão**

**3.1.** Avaliação do procedimento de digestão das amostras de própolis *in natura* quanto a acidez e teor de carbono residual

**3.2.** Avaliação do efeito de matriz

**3.3.** Figuras de mérito do método desenvolvido e avaliação da exatidão

**3.4.** Análise de amostras de própolis *in natura* do estado da Bahia

### **4. Conclusões**

## 1. Introdução

A própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas. Além disto, é associada a secreções salivares das abelhas, cera e pólen para elaboração final do produto que tem como principal função a proteção da colméia contra a entrada de agentes patogênicos.<sup>1</sup> A composição química da própolis é variada, apresentando em média 55% em resinas e bálsamos, 30% em ceras, 10% em óleos voláteis e por fim, 5% em pólen. Os compostos orgânicos majoritários presentes na composição da própolis são ácido benzóico e derivados, álcoois, ácido cinâmico, benzaldeído, compostos terpênicos, ácido salicílico e flavonóides. A própolis também contém em sua composição minerais, entre os quais se destacam Mn, Zn, Ca e Cu, além de vitaminas (B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico e pantotênico) e aminoácidos.<sup>2,3</sup>

A própolis é um produto que tem seu uso disseminado por todas as camadas da população. Participa desde a composição de xaropes até a formulação de cremes para aplicação dermatológica. Contudo, a composição da própolis é dependente do tipo de abelha, localização geográfica e clima, o que condiciona a qualidade do produto a diversos fatores, além de uma maior probabilidade de contaminação em função da exposição ambiental.<sup>4,5</sup>

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos visando avaliar os benefícios e novas formas de utilização da própolis,<sup>6,7</sup> o que deve implicar em uma maior demanda pelo produto *in natura* em nível nacional e internacional. No Brasil, os produtos apícolas, incluindo a própolis, são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e apresentam legislações específicas.<sup>8,9</sup> A própolis é considerada como alimento segundo o MAPA, dispondo de requisitos mínimos de qualidade quando *in natura* ou como extrato alcoólico. A classificação da própolis é

realizada segundo teor de flavonóides, propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e consistência), requisitos físico-químicos (umidade, cera e cinzas), localização geográfica e ausência de contaminantes e aditivos de origem sintética. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento propõe alguns procedimentos para determinação de espécies inorgânicas em alimentos, contudo, não reporta ou recomenda metodologia para amostras de própolis *in natura*. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes que possam atender aos principais parâmetros de qualidade quanto à caracterização mineral requerida pelo mercado interno e externo.

O número de trabalhos relacionados à caracterização da composição mineral de amostras de própolis *in natura* e extratos alcoólicos empregando técnicas espectroanalíticas é reduzido,<sup>10-14</sup> visto que a maioria dos estudos relacionados a derivados de produtos de origem apícola são associados a amostras de mel. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de metodologia analítica para determinação de micronutrientes (Na, K, Mg e Ca) em amostras de própolis *in natura* produzidas no Estado da Bahia. Desta forma, empregou-se a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama com fonte contínua de alta resolução (HR-CS FAAS), visto que esta técnica permite a determinação multielementar de espécies essenciais, é de fácil implementação em análise de rotina e de baixo custo operacional.<sup>15-17</sup>

## 2. Experimental

### 2.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água ultrapura (com resistividade específica de 18,2 M $\Omega$  cm), a partir de um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA,

USA). Ácido nítrico concentrado (Merck) e peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Merck) foram utilizados no procedimento de digestão das amostras. As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição adequada da solução estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> em Ca, K, Mg e Na (Merck). Seguindo recomendação do fabricante do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, nas amostras e padrões analíticos a concentração final de HCl ou HNO<sub>3</sub> (Merck) foi ajustada em 1% (v/v).

## 2.2. Instrumentação

Os procedimentos de digestão em

sistemas pressurizados foram conduzidos em forno de micro-ondas com cavidade, modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália). Esse sistema possui um rotor com capacidade para 10 frascos de 100 mL confeccionados em TFM (teflon quimicamente modificado) e opera sob altas temperaturas e pressões.

Para determinação dos elementos de interesse foi empregado um espectrômetro de absorção atômica com chama de alta resolução com fonte contínua (modelo ContraAA 300, Analytica Jena). Todas as medidas foram realizadas em triplicata empregando nebulizador do tipo pneumático concêntrico. Os comprimentos de onda (nm) relativos às linhas primárias e as condições experimentais utilizadas são apresentados na Tabela 1.<sup>15</sup>

**Tabela 1.** Condições experimentais utilizadas no procedimento proposto empregando espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

Parâmetros	Elementos			
	Na	K	Mg	Ca
Linha de medida, nm	588,9953	766,4908	285,2125	422,6728
Tipo de Chama	Ar/acetileno	Ar/acetileno	Ar/acetileno	N <sub>2</sub> O/acetileno
Vazão de acetileno, L h <sup>-1</sup>	90	80	70	215
Altura do queimador, mm	4-8	5-9	5-8	5-8

Para comparação dos resultados obtidos a partir do espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua foi empregado espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) simultâneo com visão axial e detector de estado sólido VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália). As condições operacionais empregadas foram as seguintes: potência RF (1,3 kW), vazão do gás de nebulização (1,5 L min<sup>-1</sup>), vazão do gás do plasma (15 L min<sup>-1</sup>), vazão do gás auxiliar (1,5 L min<sup>-1</sup>) e sistema de introdução da amostra (nebulizador *seaspray* com câmara de nebulização ciclônica). As linhas espectrais (nm) selecionadas foram: Ca 396,847 (atômica); K 766,468 (iônica); Na 589,592 (iônica) e Mg 280,267 (atômica). Como padrão interno nas análises das amostras de

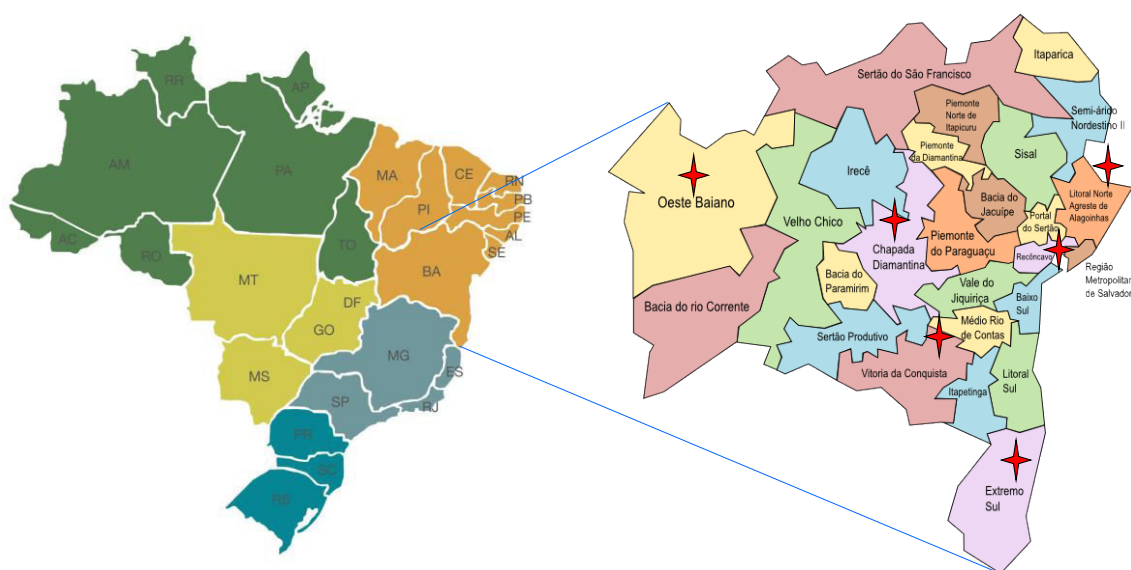
própolis foi empregado ítrio na concentração final de 1,0 mg L<sup>-1</sup> em todos os digeridos.<sup>13</sup>

## 2.3. Amostras

Todas as amostras de própolis *in natura* foram obtidas de colmeias de abelhas (*Apis mellifera*). Foram obtidas 48 amostras de própolis *in natura* provenientes de seis regiões distintas do estado da Bahia, sendo: Litoral Norte ( $n = 27$ ), região Oeste ( $n = 4$ ), Chapada Diamantina ( $n = 5$ ), região Sul ( $n = 2$ ), Recôncavo Baiano ( $n = 5$ ) e região Sudoeste ( $n = 5$ ). Os valores entre parêntesis são relativos ao número de amostra de cada região, sendo que cada amostra foi analisada individualmente quanto ao teor de Ca, K, Na

e Mg. O Litoral Norte foi a região com maior número de amostras em função do grande número de apiários a facilidade de amostragem. Para garantir a homogeneidade das amostras, estas foram submetidas a aquecimento por 6 s em forno micro-ondas doméstico (potência máxima) com posterior maceração, quando necessário. A Figura 1 indica as regiões de coleta das amostras de própolis no Estado da Bahia. O critério de

seleção das regiões para amostragem considerou as diferenças climáticas, vegetação e proximidade com o litoral visando avaliar uma possível influência quanto a distribuição dos micronutrientes avaliados. Os resultados para cada elemento foram expressos em termos de valor mínimo e máximo, média e desvio-padrão em função de cada região e do respectivo número de amostras analisadas.



**Figura 1.** Mapa do estado da Bahia em perspectiva ao Brasil indicando as seis regiões de coleta das amostras de própolis (marcação em vermelho) analisadas

#### 2.4. Procedimento de digestão assistida por micro-ondas

O procedimento empregando forno de micro-ondas com cavidade constituiu da pesagem de aproximadamente 200 mg de amostra de própolis *in natura*, adição de 5,0 mL HNO<sub>3</sub> (14 mol L<sup>-1</sup>) e 3,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v). O programa de aquecimento utilizado

encontra-se descrito na Tabela 2, sendo os valores máximos de potência e pressão de 1000 W e 35 bar, respectivamente. Após este procedimento, os digeridos foram transferidos para tubos de centrífuga e o volume foi completado para 20 mL com água ultrapura. O procedimento descrito foi avaliado quanto a diferentes parâmetros em trabalho prévio do grupo, sendo assim, empregando para digestão das amostras.<sup>13</sup>

**Tabela 2.** Programa utilizado para digestão das amostras de própolis *in natura* empregando forno de micro-ondas com cavidade

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	500	4 (rampa)	90
2	500	2 (patamar)	90
3	1000	6 (rampa)	180
4	1000	10 (patamar)	180
5	-	20 (ventilação)	-

## 2.5. Determinação da acidez final dos digeridos

A acidez final dos digeridos foi determinada utilizando volumetria de neutralização. O procedimento consistiu da tomada de uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  dos digeridos, os quais foram transferidos para erlenmeyer de 10 mL. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de água ultrapura e titulou-se com solução padronizada de NaOH 0,09972 mol L<sup>-1</sup> empregando solução etanólica de fenolftaleína 1,0% (m/v) como indicador visual.

## 2.6. Determinação do teor de carbono residual dos digeridos

O teor de carbono residual corresponde à fração do carbono original remanescente após a decomposição da amostra. O teor de carbono residual foi determinado visando avaliar a eficiência do processo de digestão, visto as amostras de própolis *in natura* apresentarem uma composição complexa. No presente estudo, a determinação do teor de carbono residual presente nos digeridos foi determinada por ICP OES, utilizando a linha de emissão do carbono (193,091 nm). A curva analítica para obter o teor de carbono residual foi construída com ureia para faixa de concentração de 10 - 400 mg L<sup>-1</sup> contendo oito pontos, sendo cada concentração medida em triplicata.<sup>18</sup>

## 2.7. Figuras de mérito e avaliação da exatidão

No método proposto os seguintes parâmetros faixa linear, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (baseada na repetibilidade) foram avaliados para cada analito.<sup>19</sup>

A própolis é uma resina balsâmica e não há material de referência certificado (CRM) ou similar, portanto para avaliar a exatidão foram utilizadas três estratégias: (1) ensaio

de adição e recuperação, (2) utilização de dois materiais de referência certificados, NIST 1515 (folhas de maçã) e NIST 1570a (folhas de espinafre) e (3) comparação dos resultados obtidos com outra técnica (neste caso foi empregado ICP OES). O ensaio de adição e recuperação de analito foi aplicado em três amostras de própolis *in natura* (denominadas de A, B e C), nos níveis de concentração dos elementos presentes na matriz. As adições foram realizadas a partir de solução multielementar de concentração 200 mg L<sup>-1</sup> (Merck) em três níveis de concentração. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de decomposição por micro-ondas e as determinações realizadas por HR-CS FAAS. Para a determinação dos analitos no CRM foi empregada uma massa de aproximadamente 250 mg do material de referência. Em seguida, foi aplicado o mesmo procedimento experimental quanto à digestão e medição dos sinais analíticos empregando HR-CS FAAS. A comparação dos resultados empregando uma segunda técnica foi realizada a partir das determinações de Na, K, Mg e Ca em três amostras de própolis *in natura* (denominadas de A, B e C) por HR-CS FAAS e ICP OES.

## 3. Resultados e discussão

As concentrações de Na, K, Mg e Ca nas amostras de própolis *in natura* foram determinadas por HR-CS FAAS, de forma a avaliar a aplicabilidade desta técnica para esta matriz complexa empregando digestão assistida por micro-ondas para decomposição das amostras. Quanto ao método espectrométrico desenvolvido foram investigados os seguintes parâmetros analíticos: faixa linear, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade) e exatidão.

### 3.1. Avaliação do procedimento de digestão das amostras de própolis *in natura* quanto a acidez e teor de carbono residual

A acidez final dos digeridos foi determinada utilizando volumetria de neutralização. As amostras submetidas ao procedimento de digestão assistida por micro-ondas tiveram acidez igual a  $4,40 \pm 0,10 \text{ mol L}^{-1}$  ( $n = 3$ ). O teor de carbono residual, determinado empregando ICP OES, foi calculado como sendo  $0,46 \pm 0,02\%$  (m/v) ( $n = 3$ ). Estes resultados indicam a eficiência do procedimento de digestão assistida por micro-ondas para amostras complexas e com alto teor de carbono orgânico como a própolis *in natura*,<sup>13,18</sup> visto que sua composição corresponde em média a 95% em resinas, bálsamos, ceras, óleos e pólen.<sup>1-4</sup>

### 3.2 Avaliação do efeito de matriz

Um possível efeito da matriz sobre o sinal analítico foi avaliado usando a técnica de adição de analito, construindo-se curvas analíticas em diferentes meios: ácido nítrico diluído ( $4,40 \text{ mol L}^{-1}$ ), branco (digerido) e digerido de três amostras distintas (A, B e C).<sup>20</sup> Para cada condição, as curvas analíticas foram preparadas nas seguintes faixas de concentração:  $0,20 - 4,0 \text{ mg L}^{-1}$  para Mg e  $0,20 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$  para K, Na e Ca, com no mínimo sete pontos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, onde se obteve coeficiente de correlação linear ( $r$ ) maior ou igual a 0,9976 considerando todas as condições avaliadas.

Os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas analíticas apresentados na Tabela 3 nas diferentes condições químicas foram comparados. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que não houve interferência por efeito de matriz (própolis) na determinação de K, Ca, Na e Mg empregando HR-CS FAAS.

**Tabela 3.** Inclinações das curvas analíticas para K, Na, Mg e Ca em diferentes meios empregando HR-CS FAAS

Elemento	Condição				
	HNO <sub>3</sub> ( $4,4 \text{ mol L}^{-1}$ )	Branco	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Na	0,717	0,718	0,716	0,717	0,719
K	0,947	0,921	0,956	0,964	0,966
Mg	0,689	0,699	0,692	0,690	0,695
Ca	0,522	0,515	0,529	0,523	0,520

Para avaliação estatística destes resultados empregou-se análise de variância de fator único (ANOVA),<sup>21</sup> não sendo observada diferença significativa para um nível de confiança de 95% em relação aos valores de inclinação das curvas analíticas para os diferentes meios avaliados, visto que  $F_{\text{calculado}} = 0,0029$  foi menor que  $F_{\text{crítico}} = 3,0556$  ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ ).

### 3.4. Figuras de mérito do método desenvolvido e avaliação da exatidão

Para a obtenção das figuras de mérito do método desenvolvido foram realizados dez ensaios independentes correspondentes ao branco analítico submetidos ao processo de decomposição por micro-ondas. Os respectivos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculadas a partir das equações descritas abaixo:

$$\text{LOD} = \frac{x_{\text{branco}} + 3,3s_{\text{branco}}}{S} \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{LOQ} = \frac{x_{\text{branco}} + 10s_{\text{branco}}}{S} \quad \text{Equação (2)}$$

onde  $x_{\text{branco}}$  representa a média dos valores do branco,  $s_{\text{branco}}$  o desvio-padrão amostral dos valores do branco e  $S$  corresponde a sensibilidade do método (coeficiente angular

da curva analítica).<sup>19</sup> Os parâmetros relativos às curvas analíticas são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Figuras de mérito obtidas por HR-CS FAAS

Elemento	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg g <sup>-1</sup> )
Na	0,13 – 2,50	0,04	0,13	6,50
K	0,16 – 3,00	0,05	0,16	8,00
Mg	0,09 – 2,50	0,03	0,09	4,50
Ca	0,27 – 2,50	0,08	0,27	13,5

A faixa linear para os elementos avaliados, bem como os valores de LOD e LOQ obtidos tanto em solução quanto a partir da massa da amostra empregada no procedimento de digestão mostram-se adequados para determinação de Na, K, Mg e Ca em amostras de própolis *in natura*.

A precisão (repetitividade) do método foi avaliada utilizando o desvio-padrão relativo a partir de dez ensaios empregando a menor e maior concentração dos elementos Na, K, Mg e Ca em função da respectiva faixa linear. O desvio-padrão relativo variou de 2,7 a 4,6% para o K e Ca, respectivamente.

A exatidão de um método analítico está associada ao grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os materiais de referência certificados (CRM) devem, sempre que possível, ser utilizados para validar um método analítico. Contudo, não há material de referência certificado (CRM) ou similar para própolis. Desta forma, empregou-se dois materiais de referência certificados, NIST 1515 (folha de maçã) e NIST 1570a (folha de espinafre) que foram submetidos ao procedimento proposto. Adicionalmente, foi

avaliado um possível efeito de matriz através de ensaio de adição e recuperação. Por fim, foram comparados os resultados relativo às concentrações de Na, K, Mg e Ca em amostras de própolis *in natura* empregando HR-CS FAAS com outra técnica (ICP OES) visando a validação do procedimento analítico proposto.

#### *Análise de material de referência certificado (CRM)*

Para avaliação da exatidão do procedimento empregando forno de micro-ondas com cavidade, amostras dos materiais de referência certificado NIST 1515 (folhas de maçã) e 1570a (folhas de espinafre) foram submetidas ao procedimento proposto para as amostras de própolis. A Tabela 5 apresenta dos valores certificados e obtidos a partir do método desenvolvido para os elementos Na, K, Mg e Ca. Para avaliação estatística dos resultados foi empregado teste *t* para comparação das concentrações obtidas com valor de referência, conforme a equação 3:



$$t = \frac{|x_{\text{médio}} + \mu_0|}{s} \sqrt{n} \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $n$  é o número de replicatas para obter a concentração média ( $x_{\text{médio}}$ ) e o respectivo desvio-padrão ( $s$ ), e  $\mu_0$  é o valor de referência.<sup>19,21</sup>

A partir da aplicação do teste  $t$  (para valor de referência) os resultados apresentados na

Tabela 5 não diferem significativamente para um intervalo de confiança de 95% considerando como critério  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ . Assim, pôde-se inferir que o método foi exato para os analitos Na, K, Mg e Ca.

**Tabela 5.** Comparação dos valores certificados de Na, K, Mg e Ca ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n = 3$ )

Elemento	NIST 1515 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		$t_{\text{cal}}^{***}$	NIST 1570 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		$t_{\text{cal}}^{***}$
	Certificado	Obtido		Certificado	Obtido	
Na	24,4 ± 1,2	25,7 ± 0,8	0,94	1,818 ± 0,043*	1,831 ± 0,034	0,22
K	1,610 ± 0,020	1,482 ± 0,044	1,68	2,903 ± 0,052	3,044 ± 0,035	2,33
Mg	0,271 ± 0,008	0,264 ± 0,006	0,67	0,89**	0,82 ± 0,01	4,04
Ca	1,526 ± 0,015	1,538 ± 0,007	0,99	1,527 ± 0,041	1,500 ± 0,031	0,50

\*concentração em percentual (m/m) // \*\*valor não certificado // \*\*\* $t_{\text{crítico}} = 4,30$  para o intervalo de 95% de confiança.

#### Ensaio de adição e recuperação

Para o ensaio de recuperação foram avaliados três níveis de concentração (para cada elemento) a partir da adição de Na, K, Mg e Ca nas amostras de própolis *in natura* analisadas, antes do procedimento de digestão. As concentrações adicionadas

dependeram da concentração inicial dos analitos (Na, K, Mg e Ca) nos digeridos. Desta forma, foi estabelecido os níveis de adição em termos percentuais a concentração inicial de cada elemento, sendo nível 1 (50%), 2 (100%) e 3 (150%). Os resultados para o ensaio de recuperação são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Ensaio de adição e recuperação para Na, K, Mg e Ca em amostras de própolis *in natura* por HR-CS FAAS (média ± desvio-padrão,  $n = 3$ )

Elemento	Nível de concentração	Recuperação, %		
		Amostra A	Amostra B	Amostra C
Na	1	94 ± 5	99 ± 5	110 ± 5
	2	108 ± 14	99 ± 2	91 ± 2
	3	97 ± 1	104 ± 5	93 ± 2
K	1	86 ± 6	100 ± 1	99 ± 4
	2	103 ± 8	92 ± 1	92 ± 2
	3	98 ± 4	95 ± 4	101 ± 1
Mg	1	110 ± 9	96 ± 5	97 ± 5
	2	99 ± 2	100 ± 1	99 ± 1
	3	98 ± 6	92 ± 1	94 ± 4
Ca	1	96 ± 4	97 ± 5	99 ± 3
	2	94 ± 7	99 ± 1	97 ± 6
	3	98 ± 1	94 ± 4	99 ± 1

A faixa de recuperação variou de 91 a 110; 86 a 103; 92 a 110 e 94 a 99% para Na, K, Mg e Ca, respectivamente. De modo geral as recuperações foram quantitativas, indicando que o procedimento não apresentou efeito de matriz.

*Comparação dos resultados do HR-CS FAAS com ICP OES*

Nesta etapa, os resultados obtidos por HR-CS FAAS na determinação dos elementos Na, K, Mg e Ca em amostras de própolis *in natura*, foram comparados com os valores de concentração obtidos por ICP OES. Os resultados relativos para esta avaliação são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Comparação das concentrações de Na, K, Mg e Ca nas amostras de própolis *in natura* empregando HR-CS FAAS e ICP OES (média  $\pm$  desvio-padrão;  $n = 3$ )

Elemento	Amostras ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	A		B		C	
	HR-CS FAAS	ICP OES	HR-CS FAAS	ICP OES	HR-CS FAAS	ICP OES
Na	189 $\pm$ 4	169 $\pm$ 8	92 $\pm$ 2	98 $\pm$ 6	243 $\pm$ 2	254 $\pm$ 20
K	257 $\pm$ 4	251 $\pm$ 4	753 $\pm$ 45	749 $\pm$ 21	965 $\pm$ 5	994 $\pm$ 12
Mg	141 $\pm$ 4	144 $\pm$ 1	238 $\pm$ 3	234 $\pm$ 13	626 $\pm$ 1	632 $\pm$ 63
Ca	321 $\pm$ 2	315 $\pm$ 10	684 $\pm$ 59	616 $\pm$ 23	1355 $\pm$ 99	1369 $\pm$ 103

Para avaliação estatística dos dados referentes a Tabela 7 foi aplicado teste  $t$  (pareado) em função de cada amostra A, B e

C. Para tanto, foi utilizada a seguinte equação:

$$t = \frac{|d|}{s} \sqrt{n} \quad \text{Equação (4)}$$

onde  $|d|$  é o valor absoluto da diferença entre médias para dois resultados de cada amostra,  $s$  é o desvio-padrão das  $n$  diferenças, e por fim,  $n$  é o número de amostras.<sup>19,21</sup> Assim, para as amostras de própolis *in natura* A, B e C foram obtidos os seguintes valores de  $t_{\text{calculado}}$  1,53; 1,03 e 3,03; respectivamente, a partir da quantificação dos elementos Na, K, Mg e Ca. Desta forma, como  $t_{\text{crítico}} = 3,18$  não foi observada diferença significativa para o intervalo de confiança ao nível 95% ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ ), indicando similaridade estatística entre os resultados para as duas técnicas avaliadas.

### 3.5. Análise de amostras de própolis *in natura* do estado da Bahia

O procedimento proposto foi aplicado à determinação de Na, K, Mg e Ca por HR-CS FAAS em 48 amostras de própolis *in natura* provenientes de diferentes apiários localizados em distintas regiões geográficas do estado da Bahia. A média, desvio-padrão e faixa de concentração (valor máximo e mínimo) para amostras de cada região são apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valor mínimo, máximo, média e desvio-padrão das concentrações de Na, K, Mg e Ca determinados em triplicata por HR-CS FAAS nas amostras de própolis *in natura* provenientes de diferentes apiários localizados em regiões geográficas distintas do estado da Bahia: Litoral Norte (LN,  $n = 27$ ), região Oeste (RO,  $n = 4$ ), Chapada Diamantina (CD,  $n = 5$ ), região Sul (RS,  $n = 2$ ), Recôncavo Baiano (RB,  $n = 5$ ) e região Sudoeste (RSE,  $n = 5$ )

Elemento	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) por região geográfica					
	LN	RO	CD	RS	RB	RSE
Na (Min-máx)	69 ± 32 (5,23-97)	23 ± 1 (22-24)	20 ± 4 (15-24)	93 ± 5 (89-96)	24 ± 12 (11-40)	24 ± 8 (12-35)
K (Min-máx)	1440 ± 373 (776-1892)	735 ± 41 (690-787)	829 ± 40 (759-859)	1531 ± 168 (1412-1650)	240 ± 6 (231-248)	231 ± 29 (199-279)
Mg (Min-máx)	247 ± 58 (162-364)	319 ± 58 (234-362)	331 ± 32 (276-350)	309 ± 110 (231-387)	197 ± 28 (157-245)	206 ± 20 (178-232)
Ca (Min-máx)	370 ± 83 (267-545)	530 ± 21 (499-545)	500 ± 62 (423-587)	713 ± 546 (327-1099)	468 ± 81 (412-615)	466 ± 92 (313-567)

máx = valor máximo // min = valor mínimo

Todas as amostras apresentaram altos teores de K e Ca. Os maiores valores relativos a concentração de Mg foram encontrados em amostras de própolis próximas ao litoral. As concentrações de Mg variaram de 276 a 350  $\mu\text{g g}^{-1}$  para amostras coletadas na Chapada Diamantina, de 162 a 364  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o Litoral Norte, e 178 a 232  $\mu\text{g g}^{-1}$  para amostras oriundas da região Sudoeste. Para o Na a maior variação foi observada nas amostras coletadas no Litoral Norte, obtendo-se concentrações na faixa de 5,23 a 97  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Desta forma, fica evidente a influência da região de coleta das amostras de própolis quanto a concentração dos elementos avaliados, constituindo um fator importante a ser considerado em procedimentos de controle de qualidade.

#### 4. Conclusões

O emprego da técnica HR-CS FAAS mostrou-se ser uma excelente alternativa para determinação de Na, K, Mg e Ca em amostras de própolis *in natura* digeridas usando procedimento com aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade. Não foi observado efeito de matriz em função dos resultados obtidos no ensaio de recuperação, obtendo-se recuperações na faixa de 86 a

110%. Além disto, o procedimento proposto foi avaliado frente a dois materiais de referência certificados e comparação dos resultados empregando uma técnica analítica alternativa (ICP OES), e em ambos os casos não foi observada diferença significativa para os resultados obtidos ao nível de confiança de 95%. Por fim, o procedimento foi aplicado na análise de 48 amostras de própolis *in natura* de diferentes regiões geográficas da Bahia sendo K e Ca os elementos mais abundantes nas amostras analisadas.

#### Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES, FAPESB, IQ-UFBA e IQB-UFAL.

#### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Cabral, I. S. R.; Oldoni, T. L. C.; Prado, A.; Bezerra, R. M. N.; Matias de Alencar, S.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* **2009**, 32, 1523. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Ishii, E.; Midorikawa, K.; Kadota, S.

- Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> Huang, S.; Zhang, C. P.; Wang, K.; Li, G. Q.; Hu, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* **2014**, *19*, 19610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>4</sup> Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Santos, J. M. T.; Rosa, M. R.; Quinária, S. P.; Torres, Y. R.; Santa, H. S. D.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Ferreira, P. M. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova* **2009**, *32*, 296. [[CrossRef](#)]
- <sup>5</sup> Toreti, V. C.; Sato, H. H.; Pastore, G. M.; and Park, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, 697390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Sforcina, J. M.; Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *133*, 253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Patel, S. Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *Journal of Dietary Supplements* **2016**, *13*, 245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Ministério da Agricultura, Instrução Normativa Nº 3 (Anexo VI), 19/01/2001. [[Link](#)]
- <sup>9</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa Nº 11, 20/10/2000. [[Link](#)]
- <sup>10</sup> Gonzáles-Rodríguez, E.; Blázquez-Abellán, G.; Orzáez-Villanueva, M. T. Macroelements in dietetic products containing propolis. *Food Chemistry* **1999**, *66*, 15. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Conti, M. E.; Botre, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* **2001**, *69*, 267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Sales, A.; Alvarez, A.; Areal, M. R.; Maldonado, L.; Marchisio, P.; Podriguez, M.; Bedascarrasbure, E. The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-vis. *Journal of Hazardous Materials* **2006**, *137*, 1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Korn, M. G. A.; Guida, M. A. B.; Barbosa, J. T. P.; Torres, E. A.; Fernandes, A. P.; Santos, J. C. C., Dantas, K. G. F.; Nóbrega, J. A. Evaluation of sample preparation procedures for trace element determination in Brazilian propolis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and their discrimination according to geographic region. *Food Analytical Methods* **2013**, *6*, 872. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Lima, B.; Tapia, A.; Luna, L.; Fabani, M. P.; Schmeda-Hirschmann, G.; Podio, N. S.; Wunderlin, D. A.; Feresin, G. E. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Borges, D. L. G.; Curtius, A. J.; Welz, B. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte continua. *Revista Analytica* **2005**, *18*, 58. [[Link](#)]
- <sup>16</sup> Cardilia, C.; Raposo, Junior, J. L.; Cavalheiro, A. J.; Gomes Neto, J. A. A simple method based on HR-CS FAAS for multi-element determination of Cu, Fe, Mn and Zn in medicinal plants. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* **2011**, *6*, 291. [[Link](#)]
- <sup>17</sup> Welz, B.; Vale, M. G. R.; Pereira, E. R.; Castilho, I. N. B.; Dessuy, M. B. Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects – a critical review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2014**, *25*, 799. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Gouveia, S. T.; Silva, F. V.; Costa, L. M.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A.

Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 445, 269. [[CrossRef](#)]

<sup>19</sup> Livro: Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant, T. J. D.; *Practical Statistics for the Analytical Scientist – A Bench Guide*, 2<sup>th</sup> ed., RSC Publishing: Cambridge, 2009.

<sup>20</sup> Castro, J. T.; Santos, E. C.; Santos, W. P. C.; Costa, L. M.; Korn, M.; Nóbrega, J. A.; Korn,

M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* **2009**, 78, 1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>21</sup> Livro: Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6<sup>th</sup> ed., Prattice-Hall: London, 2010.