



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA BAHIA - UNEB**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - DECET**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA**

LUCIANO ALMEIDA DE ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO VERDE PARA  
EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
BIOATIVOS EM PRÓPOLIS POR HPLC-DAD**

SALVADOR - BAHIA

2024

LUCIANO ALMEIDA DE ALBUQUERQUE

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO VERDE PARA  
EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
BIOATIVOS EM PRÓPOLIS POR HPLC-DAD**

Dissertação apresentada ao programa de Pós  
graduação em Química Aplicada, como parte  
dos requisitos necessários à obtenção do título  
de Mestre em Química Aplicada.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Dias

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora de Andrade  
Santana

SALVADOR – BAHIA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA  
Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura** - UNEB - Campus I  
Bibliotecária: **Célia Maria da Costa** - CRB5/918

A345d Albuquerque, Luciano Almeida de  
Desenvolvimento de método analítico verde para extração e  
determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis por HPLC-DAD /  
Luciano Almeida de Albuquerque . - Salvador, 2024.  
82 f. : il.

Orientador: Fábio de Souza Dias.

Coorientadora: Débora de Andrade Santana.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade do Estado da Bahia.  
Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em  
Química Aplicada - PGQA. Campus I. 2024.

Contém referências.

1. NADES. 2. HPLC-DAD. 3. Compostos fenólicos. 4. Própolis. 5.  
Química ambiental. I. Dias, Fábio de Souza. II. Santana, Débora de Andrade  
III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida.  
Campus I. IV. Título.

CDD:

577.14

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 As Abelhas</b> .....	16
<b>2.2 A própolis</b> .....	17
<b>2.3 Compostos Fenólicos Bioativos</b> .....	19
<b>2.4 Extração de Compostos Fenólicos Bioativos</b> .....	22
<b>2.5 Solventes Eutéticos Profundos(DES) e Solventes Eutéticos Naturais Profundo (NADES)</b> .....	26
<b>2.6 Otimização de Procedimentos de Extração</b> .....	29
<b>2.7 Química Verde</b> .....	31
2.7.1 Métricas Verde .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	35
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	35
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1 Solventes e reagentes</b> .....	36
<b>4.2 Instrumentos</b> .....	36
<b>4.3 Coleta das amostras</b> .....	36
<b>4.4 Determinação do teor de Compostos Fenólicos totais utilizando Folin- Ciocalteu</b> .....	37
<b>4.5 Determinação do teor de compostos Flavonoides totais por espectrofotometria</b> .....	37
<b>4.6 Otimização da síntese do NADESs e extração dos compostos Fenólicos</b> .....	38
4.6.1 Planejamento de misturas .....	38
4.6.2 Otimização de extração compostos fenólicos .....	38
<b>4.7 Determinação de Compostos Fenólicos Bioativos por HPLC-DAD</b> .....	40
4.7.1 Preparo das amostras para análise .....	40

4.7.2	Análise Cromatográfica .....	40
4.8	Algoritmo AGREE .....	41
4.9	Algoritmo AGREEprep .....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1	<b>Solventes Eutéticos Naturais Profundos .....</b>	<b>43</b>
5.2	<b>Otimização da proporção dos componentes do NADES LGH .....</b>	<b>43</b>
5.3	<b>Otimização do Procedimento de Extração .....</b>	<b>45</b>
5.4	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos totais por espectrofotometria .....</b>	<b>50</b>
5.4	<b>Determinação do teor de compostos flavonoídes totais por espectrofotometria .....</b>	<b>52</b>
5.6	<b>Caracterização dos NADES .....</b>	<b>53</b>
5.6.1	Análise por ATR FTIR .....	53
5.6.2	Viscosidade .....	55
5.7	<b>Características analíticas .....</b>	<b>57</b>
5.7.1	Linearidade .....	58
5.7.2	Limite de Detecção (LD) .....	58
5.7.3	Limite de Quantificação (LQ) .....	59
5.7.4	Precisão .....	61
5.7.5	Exatidão .....	62
5.7.6	Ensaio de Recuperação .....	62
5.8	<b>Métricas Verde .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>

***À minha amada família,***

*A vocês, in memoriam de meus queridos avós, cujo amor e sabedoria moldaram os alicerces do meu ser, dedico este trabalho. Vocês foram os guardiões da nossa história, os pilares de nossa família, e sua presença em minha vida foi uma benção sem igual. Obrigado por inspirarem meu caminho com sua força e ternura.*

*À minha irmã Rafaela Albuquerque e meu irmão Diogo Albuquerque, companheiros de jornada desde o primeiro dia, agradeço por seu apoio incondicional, orgulho e admiração que sentem por mim e serem fontes inesgotáveis de incentivo e amor. Suas palavras de encorajamento foram luzes guias nos momentos de desafio, e sua presença foi o conforto que busquei sempre .*

*Aos meus sobrinhos, João Alexandre, Isabela Navarro de Albuquerque e Diogo Navarro de Albuquerque, cuja inocência e alegria trouxeram cores ainda mais vibrantes ao meu mundo, dedico este trabalho com esperança no futuro que vocês representam. Que possam crescer cercados de amor, conhecimento e oportunidades.*

*Que esta dissertação seja um tributo não apenas ao conhecimento adquirido, mas também ao apoio e amor que recebi ao longo desta jornada. A vocês, minha família, meu eterno agradecimento.*

*Com amor e gratidão.*

## Dedicatória

*Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram de maneira significativa para a realização deste trabalho.*

*Primeiramente, ao Prof. Dr. Fábio Dias, não apenas meu orientador, mas também um amigo incrível. Nos momentos de desespero, sua presença ao meu lado foi fundamental, sempre oferecendo apoio, atenção e amizade. Sua humanidade e justiça são inspirações para mim, e sou imensamente grato por toda sua orientação e suporte.*

*À Prof. Dra. Débora Andrade (UNEB), pela dedicação, carinho, atenção e compreensão demonstrados ao longo desta jornada. Seu apoio foi fundamental para que eu superasse os desafios e chegasse até aqui.*

*À Prof. Dr. Walter Nei Lopes (UNEB), pela atenção, cuidado e suporte durante o início da minha jornada.*

*À Prof. Dr. Sérgio Oliva (UFBA), meu sincero agradecimento por toda confiança, atenção e cuidado. Ao ceder seu laboratório de forma incondicional, permitiu que minha pesquisa se desenvolvesse. Sua generosidade foi essencial para o progresso deste trabalho, e por isso, serei eternamente grato.*

*À Prof. Dr. Leonardo Sena (UFBA), pela simpatia e carinho desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Sua receptividade e apoio foram fundamentais para minha jornada acadêmica.*

*À Profa. Dr. Gisele Canuto (UFBA), pelo apoio contínuo.*

*À Suellen Gordiano, carinhosamente chamada de Su, pelo carinho, cuidado e atenção. Seus conselhos e ajuda durante os momentos difíceis foram inestimáveis, e sua presença constante foi um exemplo de superação e generosidade que serviram de exemplo para toda minha vida.*

*Não poderia deixar de agradecer também ao meu fiel companheiro de laboratório, Marcos Levi. Seu café fresco e seu bom humor foram verdadeiros bálsamos nos dias mais estressantes.*

*A todos vocês, minha mais profunda gratidão. Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e contribuição de cada um de vocês.*

*Com sincero apreço,*

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” – Leonardo da Vinci*

## Resumo

A busca por métodos de extração ambientalmente aceitáveis contribui significativamente para o campo da química analítica verde, oferecendo uma abordagem inovadora e sustentável para a extração de compostos fenólicos bioativos. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico verde para a extração e determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis e identificação por HPLC-DAD. Como alternativa ecológica aos solventes eutéticos tradicionais foi desenvolvido o NADES (3). Para a otimização da síntese do NADES foram usadas técnicas quimiométricas e confirmada sua síntese através da caracterização físico-química. O uso de ultrassom potencializou a extração dos compostos fenólicos bioativos, que posteriormente foram identificados por HPLC-DAD. As métricas verdes foram aplicadas avaliando a redução do uso de substâncias tóxicas, eficiência energética e minimização de resíduos. O método foi validado com base nesses critérios, e análises de amostras de própolis verde, vermelha e marrom demonstraram que os NADESs são eficientes e sustentáveis. A variação nos valores de Limite de Detecção (LD), Desvio Padrão Relativo (RSD) e métricas de sustentabilidade AGREE e AGREEprep reforçaram a necessidade de otimização dos parâmetros de extração para cada tipo de própolis.

**Palavras-chave:** NADES, HPLC-DAD, Compostos Fenólicos, Química Verde.

## **Abstract**

The search for environmentally acceptable extraction methods contributes significantly to the field of green analytical chemistry by offering an innovative and sustainable approach for the extraction of bioactive phenolic compounds. This work aimed to develop a green analytical method for the extraction and determination of bioactive phenolic compounds in propolis and identification by HPLC-DAD. As an ecological alternative to traditional eutectic solvents, NADES was developed (3). To optimize the synthesis of NADES, chemometric techniques were used and its synthesis was confirmed through physicochemical characterization. The use of ultrasound enhanced the extraction of bioactive phenolic compounds, which were later identified by HPLC-DAD. Green metrics were applied evaluating the reduction in the use of toxic substances, energy efficiency and waste minimization. The method was validated based on these criteria, and analyzes of green, red and brown propolis samples demonstrated that NADESs are efficient and sustainable. The variation in Limit of Detection (LOD), Relative Standard Deviation (RSD) values and sustainability metrics AGREE and AGREEprep reinforced the need to optimize extraction parameters for each type of propolis.

**Keywords:** NADES, HPLC-DAD, Phenolic Compounds, Green Chemistry.

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Abelha da espécie <i>Apis mellifera</i> .....	13
Figura 2 Variedade de Própolis: (A) Própolis verde, (B) Própolis vermelha e (C) Própolis marrom.....	14
Figura 3 – Composição centesimal de compostos encontrados na própolis.....	14
Figura 4 – Classificação dos principais compostos Fenólicos .....	16
Figura 5 – Estrutura básica do composto fenólico bioativo, (A) Fenólicos Simples e (B) Polifenólicos .....	17
Figura 6 – Estrutura e classificação dos Fenólicos.....	18
Figura 7 – Via metabólica compostos fenólicos.....	19
Figura 8 – Estruturas química dos flavonóides.....	21
Figura 9 Diagrama de fases típico e comparativo de uma solução eutético resultante da mistura de líquidos e de um solvente eutético profundo (DES).....	23
Figura 10 – Publicações sobre NADEs no período de 2013 a 2020 na Base de Dados Scopus .....	24
Figura 11 – Interpretação das referências à cor do AGREE.....	28
Figura 12 – Reação Quercetina com alumínio .....	32
Figura 13 – Superfície de resposta planejamento NADES(3) .....	38
Figura 14 – Gráfico de Desejabilidade planejamento NADES (3).....	38
Figura 15 - Concentração de Fenólicos nos NADES (M) e NADE (3).....	38
Figura 16 - Concentração de Flavonoides nos NADES (M) e NADES (3).....	38
Figura 17 – Espectroscopia no infravermelho NADES (M) x NADE (3).....	39
Figura 18 – Cromatograma Padrões Compostos Fenólicos .....	42

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais tipos de própolis, compostos fenólicos e atividades biológicas. .....	15
Tabela 2 – Composição dos solventes eutéticos profundos naturais (NADESs) .....	30
Tabela 3 - Figuras de mérito para o método utilizado na determinação de polifenóis em própolis por HPLC-DAD.....	33
Tabela 4 - Teste de adição/recuperação de compostos fenólicos em amostras Própolis. ....	40
Tabela 5 - Gradiente de eluição empregado HPLC .....	41
Tabela 6 - Parâmetros físicos NADES (M) e NADE (3) .....	55
Tabela 7 - Figuras de mérito para o método utilizado na determinação de polifenóis em própolis por CLAE-DAD .....	59
Tabela 8- Figuras de mérito para o método precisão utilizado na determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis por CLAE-DAD .....	60
Tabela 9 - Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de própolis .....	71
Tabela 10 - Características dos métodos que utilizam NADES para extração de compostos fenólicos em própolis .....	74

## Lista de abreviaturas e siglas

AA	Atividade Antioxidante
DES	Solventes Eutéticos Profundos (do inglês, <i>Deep Eutectic Solvent</i> )
AGREE	Verdes analíticos (do inglês <i>Analytical GREENes</i> )
ATR FTIR	Reflectância total atenuada - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês <i>Attenuated total reflectance - Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
GAE	Equivalente em Ácido Gálico (do inglês, <i>gallic acid equivalent</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAE	Extração Assistida por Micro-ondas (do inglês, <i>Microwave Assisted Extraction</i> )
NADES	Solventes Eutéticos Profundos (do inglês, <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> ).
TR	Tempo de Retenção
UAE	Extração Assistida por Ultrassom (do inglês, <i>Ultrasound Assisted Extraction</i> )
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (do inglês, <i>Diode Array Detector</i> )

## 1.0 INTRODUÇÃO

As abelhas da espécie *Apis mellífera* produzem uma variedade de produtos com funções específicas na colmeia, incluindo mel, cera, geleia real, pólen e própolis. O mel serve como fonte de alimento e energia para as abelhas. A cera é utilizada para construir favos, que abrigam o mel e as larvas. A geleia real é uma substância nutritiva destinada a alimentar a rainha e as larvas em desenvolvimento. O pólen atua como fonte de proteínas e nutrientes essenciais para a colônia. A própolis, uma resina coletada de árvores e modificada pelas enzimas das abelhas, é usada para selar e proteger a colméia contra patógenos (Sforcin, 2016; Bankova *et al.*, 2019).

Sendo a própolis composta por resinas vegetais, ceras, óleos essenciais e compostos fenólicos, variando conforme a vegetação e as condições ambientais (Brown *et al.*, 2019). Onde os compostos fenólicos encontrados na própolis são substâncias bioativas com significativas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, conferindo inúmeros benefícios à saúde humana. Esses compostos desempenham um papel crucial na neutralização de radicais livres, reduzindo o risco de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares. Além disso, estudos recentes indicam seu potencial na modulação do sistema imunológico e na promoção da cicatrização de feridas. Assim, a própolis, rica em compostos fenólicos, é amplamente valorizada na medicina natural (Gómez-Cansino *et al.*, 2019).

A extração dos compostos fenólicos bioativos da própolis é importante para aproveitar o potencial desse material em aplicações na indústria farmacêutica e etc. As técnicas convencionais de extração, como maceração e extração por solvente, embora eficazes, apresentam algumas desvantagens, incluindo longos tempos de extração, uso intensivo de reagentes, alto consumo de energia e a necessidade de solventes tóxicos. Essas desvantagens motivam a busca por métodos mais sustentáveis e eficientes, como os procedimentos de extração assistida, que reduzem o tempo, o consumo de energia e uso de solventes tóxicos, aumentando a eficiência e sustentabilidade do processo (Zhang *et al.*, 2020).

Os métodos alternativos ou assistidos de extração de compostos fenólicos bioativos, como ultrassom (UAE), micro-ondas (MAE) e líquido pressurizado (PLE), apresentam mais vantagens frente aos métodos convencionais. Estas técnicas melhoram significativamente a eficiência do processo, reduzindo o volume de solvente, tempo de extração e toxicidade. A extração por ultrassom, por exemplo,

utiliza ondas sonoras para quebrar as paredes celulares, facilitando a liberação dos compostos. A extração assistida por micro-ondas acelera o aquecimento uniforme do solvente, enquanto a extração por líquido pressurizado utiliza solventes em condições subcríticas, minimizando a necessidade de solventes tóxicos e gerando resíduos, estando de acordo com os princípios da química verde.(Azmir *et al.*, 2019).

A Química Verde avalia todo o ciclo de vida dos produtos químicos, aplicando um conjunto de doze princípios para otimizar processos e reduzir impactos ambientais. Esses princípios incluem: evitar desperdícios; economia atômica; sínteses menos perigosas; produtos químicos mais seguros; uso de solventes e condições de reação mais benignas; eficiência energética; uso de matérias-primas renováveis; redução de derivativos; catálise; projeto para degradação; monitoramento em tempo real e controle de processos; e química inerentemente mais segura (Tobiszewski, 2019; Clark *et al.*, 2020).

Um dos focos da Química Verde é a substituição de solventes tóxicos por alternativas mais benignas, como solventes à base de água, solventes bio-renováveis e líquidos iônicos. Além disso, a redução do volume de solventes utilizados é enfatizada, bem como a implementação de métodos livres de solventes. Essas abordagens não só diminuem os riscos ambientais e à saúde, mas também aumentam a eficiência e a segurança dos processos analíticos (Clack *et al.*, 2021).

Além da redução e substituição de solventes tóxicos por alternativas menos nocivas à estratégia da Química Verde, envolve a utilização de solventes menos tóxicos e a redução de seu volume nos processos analíticos. A evolução dessa abordagem culmina na substituição completa por solventes atóxicos, como os solventes à base de água e líquidos iônicos. Recentemente, o uso de DES (solventes eutéticos profundos) tem ganhado destaque, por serem biodegradáveis, não tóxicos e altamente eficientes na extração de compostos bioativos (Smith *et al.*, 2020)

Os Solventes Eutéticos Profundos (DES) são solventes que formam misturas líquidas e eutéticas com ponto de fusão abaixo da temperatura ambiente, derivados de compostos simples como amônia, uréia e ácidos carboxílicos. Possuem características como: baixa toxicidade, estabilidade térmica e capacidade de dissolver diversos compostos. Uma subclasse dos solventes eutéticos surgiram recentemente e são baseados em componentes naturais como: açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Estes solventes são conhecidos como Solventes Eutéticos Naturais

Profundos. Os NADES mantêm as vantagens dos DES sintéticos, enquanto oferecem uma abordagem mais sustentável e ecologicamente amigável (Zhang *et al.*, 2019).

Logo possuem baixa toxicidade, biodegradabilidade e capacidade de dissolver uma ampla gama de compostos. Amplamente explorados na extração de compostos fenólicos de fontes naturais, como plantas e resíduos agrícolas, os NADES apresentam aceitáveis níveis de eficiência e seletividade. Por exemplo, têm sido utilizados na extração de polifenóis em uvas, frutas cítricas e ervas medicinais, com aplicações em diversos setores, incluindo alimentos, cosméticos e farmacêuticos (Clark *et al.*, 2021).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método analítico verde para a extração e determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos de Diodo (HPLC-DAD).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 As Abelhas: *Apis mellifera*

A espécie *Apis mellifera*, conhecida popularmente como abelha-européia ou abelha melífera, é uma das mais importantes para a polinização de culturas agrícolas em todo o mundo. Estudos recentes têm se concentrado em compreender sua ecologia, comportamento e saúde, especialmente frente à perda de habitat, uso indiscriminado de pesticidas e mudanças climáticas (Jones *et al.*, 2020; Brown *et al.*, 2021). Pesquisas destacam a importância da diversidade genética dentro das populações de *Apis mellifera* para aumentar sua resistência a doenças e estresses ambientais (Smith *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2022). Além disso, a *Apis mellifera* Figura 1 é essencial na produção de vários produtos apícolas, como mel, cera, geleia real e própolis, que possuem diversas aplicações e benefícios para a saúde humana. O mel é amplamente utilizado como alimento e por suas propriedades antibacterianas e antioxidantes (Martins *et al.*, 2019). A cera de abelha é empregada na fabricação de cosméticos e produtos farmacêuticos devido às suas propriedades emolientes e formadoras de barreira (Silva *et al.*, 2020). A geleia real é valorizada por suas propriedades nutritivas e por potencialmente aumentar a imunidade e vitalidade (Silva *et al.*, 2020). A própolis, em particular, tem despertado interesse devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo objeto de vários estudos (Garcia *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021).

**Figura 1** – Abelha da espécie *Apis mellifera*.



Fonte: Disponível em: </media/2883234/b0309b9b7aword.png?1714489828933. Acesso em 10 mai 2024.

No âmbito da polinização agrícola, pesquisas exploram a eficácia das abelhas *Apis mellifera* com impactos de fatores ambientais e práticas agrícolas em sua atividade (Garibaldi *et al.*, 2019). Entender os padrões de comportamento de forrageamento e as preferências florais dessas abelhas é fundamental para otimizar estratégias de manejo para aumentar a produtividade das culturas dependentes de

polinização (Bartomeus *et al.*, 2018). Onde, estudos sobre a comunicação entre abelhas durante a busca por recursos têm fornecido informações sobre como os indivíduos coordenam suas atividades dentro da colmeia e durante a coleta de néctar e pólen (Seeley, 2015), desempenhando também um papel crucial na produção e dispersão da própolis (Franchin *et al.*, 2024).

A própolis é utilizada pelas abelhas para vedar frestas e diminuir o tamanho da entrada da colmeia, reduzindo o ataque de intrusos e protegendo as abelhas e suas crias do frio. Serve ainda como material antisséptico, sendo depositada no interior dos alvéolos onde a abelha rainha realiza a postura dos ovos e também é utilizada para envolver inimigos abatidos no interior da colméia, evitando que apodreçam e contaminem o ninho (Silva *et al.*, 2020; Brown; Macedo, 2019; Martinez; Gomez, 2021).

## 2.2 Própolis

A própolis é definida como “o produto elaborado pelas abelhas a partir de resinas vegetais, secreções salivares e cera” (ANVISA RDC nº 242, 2018), possuindo propriedades terapêuticas e antioxidantes (Khayyal *et al.*, 2019). Com base nisso, estudo desenvolvido por Silva *et al.* (2020) sobre o alto valor nutricional e terapêutico da própolis brasileira investiga seu impacto nas propriedades bioativas relacionadas à saúde humana.

Na Figura 2 é apresentado as variedades brasileiras de própolis possuem características químicas e biológicas diferentes, sendo estas, influenciadas por fatores como a localização geográfica e a vegetação circundante (Park *et al.*,2000).

**Figura 2** – Variedade de Própolis: (A) Própolis verde, (B) Própolis vermelha e (C) Própolis marrom.

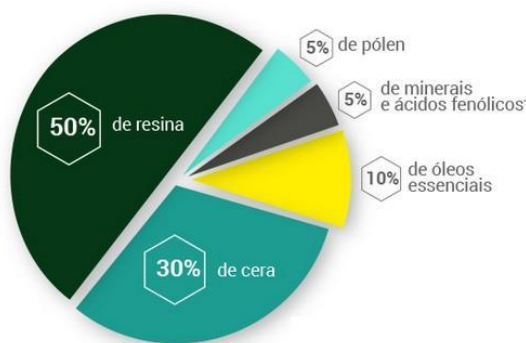


Fonte - Autoria própria (2024).

As variedades de própolis brasileira podem ser classificadas em 12 grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades biológicas. Além disso, sua importância é ressaltada quando se avalia o potencial terapêutico e alimentício das diferentes variedades (Silva *et al.*, 2020). Em virtude disso, visando explorar sua composição química e bioatividade, a classe científica tem se dedicado a compreender os sistemas de extração de compostos bioativos e seu valor alimentício no Brasil (Franchin *et al.*, 2024).

Adicionalmente, a composição química da própolis das zonas tropicais difere da própolis das zonas temperadas. A complexa composição da própolis, de origem tropical, é classificada como própolis verde, possuindo uma composição característica da região e da flora local. Os principais componentes demonstrados na Figura 3 incluem resinas, ceras, óleos essenciais, minerais, ácidos fenólicos e pólen.

**Figura 3** – Composição centesimal de compostos encontrados na própolis.



Fonte: Disponível em: <<https://cienciadapropolis.com.br/en/what-is-epp-af/propolis/>>. Acesso em: 19 mai. 2024.

No entanto, os compostos fenólicos e os polifenóis têm sido identificados como os principais compostos bioativos, presente na própolis, representados principalmente por flavonoides. Além disso, flavonoides e outros compostos como ácidos fenólicos, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são responsáveis pelas propriedades antifúngicas observados no extrato de própolis (Vargas e Arndt, 2014).

A origem botânica da própolis é um fator determinante na variação da composição e conseqüentemente nas suas propriedades terapêuticas, refletindo a diversidade da flora e o comportamento das abelhas na seleção e processamento das resinas vegetais. Com isso, é reforçado a sua importância na compreensão dos processos biológicos e químicos envolvidos na produção da própolis, contribuindo para uma melhor aplicação de suas potencialidades terapêuticas.

A própolis verde, contendo ácido artepillin C, kaempferol e quercetina, destaca-se por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Silva *et al.*, 2020). A própolis vermelha, contendo formononetina e biochanina A, possui atividades anti-inflamatórias (Martins *et al.*, 2020). Compostos como ácido cafeico na própolis marrom e pinocembrina na própolis de *Populus* evidenciam a importância dos compostos fenólicos na potencialização das atividades biológicas, promovendo benefícios à saúde humana (Souza *et al.*, 2021). A Tabela 1 ilustra a diversidade dos compostos fenólicos presentes em diferentes tipos de própolis e suas atividades biológicas.

**Tabela 1** – Principais tipos de própolis, compostos fenólicos e atividades biológicas.

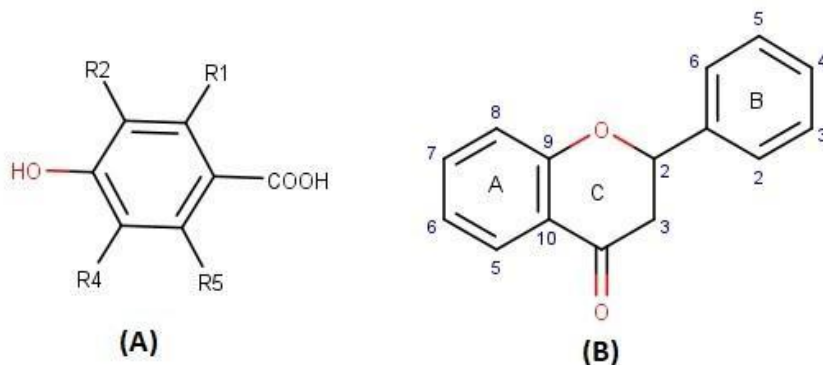
<b>Tipos de Própolis</b>	<b>Principais Compostos Fenólicos</b>	<b>Principais Atividades Biológicas Avaliadas</b>	<b>Referências</b>
Própolis Verde	Ácido Artepillin C, Kaempferol, Quercetina	Antimicrobiana, Antioxidante, Anticancerígena	SILVA <i>et al.</i> , 2020
Própolis Vermelha	Formononetina, Biochanina A, Isoflavonas	Anti-inflamatória, Antimicrobiana, Antiproliferativa	MARTINS <i>et al.</i> , 2020
Própolis Preta	Ácido Clorogênico, Catequina, Epicatequina	Antifúngica, Antioxidante, Antiinflamatória	SILVA <i>et al.</i> , 2020
Própolis de <i>Populus</i>	Pinocembrina, Galangina, Crisina	Antimicrobiana, Antioxidante, Imunomoduladora	MARTINS <i>et al.</i> , 2020

Fonte - Autoria própria (2024).

### 2.3 Compostos Fenólicos Bioativos

Os compostos fenólicos bioativos são uma classe diversificada de compostos orgânicos caracterizados por possuir pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura. Esses compostos incluem ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos, cada um com estruturas químicas distintas que influenciam em suas propriedades biológicas. Por exemplo, os ácidos fenólicos são derivados dos ácidos benzóico ou cinâmico, enquanto os flavonóides possuem uma estrutura comum baseada em dois anéis aromáticos conectados por um anel heterocíclico. A diversidade estrutural, Figura 4, desses compostos contribui para suas múltiplas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória e cardioprotetora (Lama-Muñoz *et al.*, 2022; Rein *et al.*, 2020).

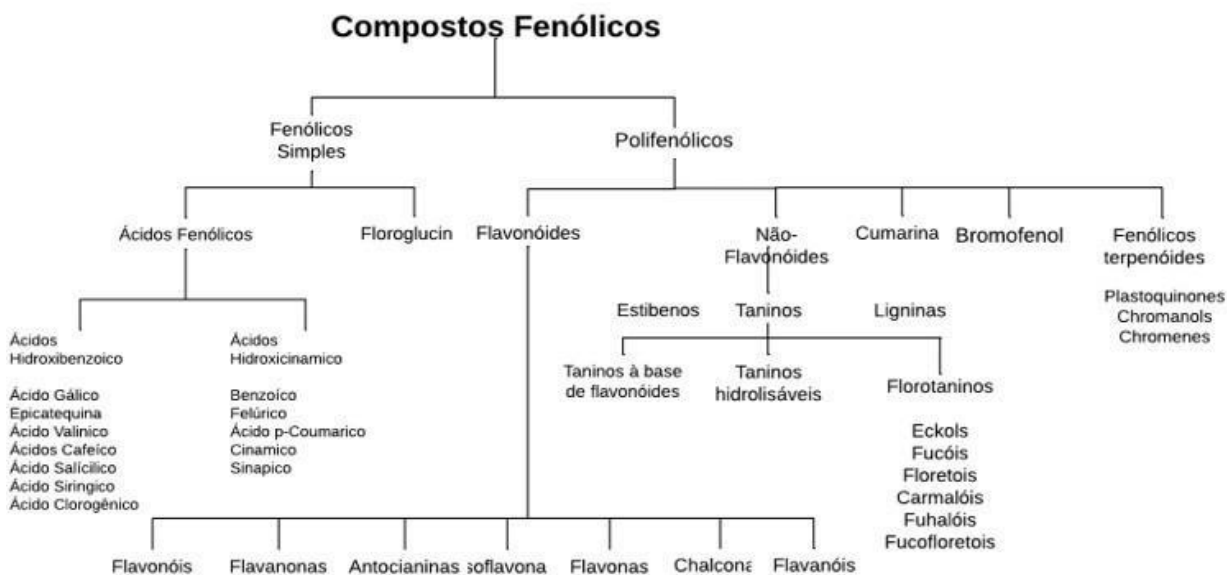
**Figura 4** – Estrutura básica do composto fenólico bioativo, (A) Fenólicos Simples e (B) Polifenólicos.



Fonte - Autoria própria (2024).

Os polifenóis estão divididos em dois grandes grupos, os flavonóides, Figura 5, e os não-flavonóides que incluem ácidos fenólicos, taninos e lignanas, enquanto os flavonóides incluem flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianinas e catequinas (Parker, 2013; Vitaglione *et al.*, 2015). Ademais, eles são frequentemente encontrados conjugados com mono ou polissacarídeos ligados a ésteres e ésteres metílicos (Vuolo *et al.*, 2019). Além disso, são caracterizados por possuírem em sua estrutura um anel benzênico um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila, conferindo assim um potencial antioxidante reagindo com os radicais livres presentes, a peroxidação lipídica e prolongando a vida útil de, por exemplo, comidas e produtos farmacêuticos.

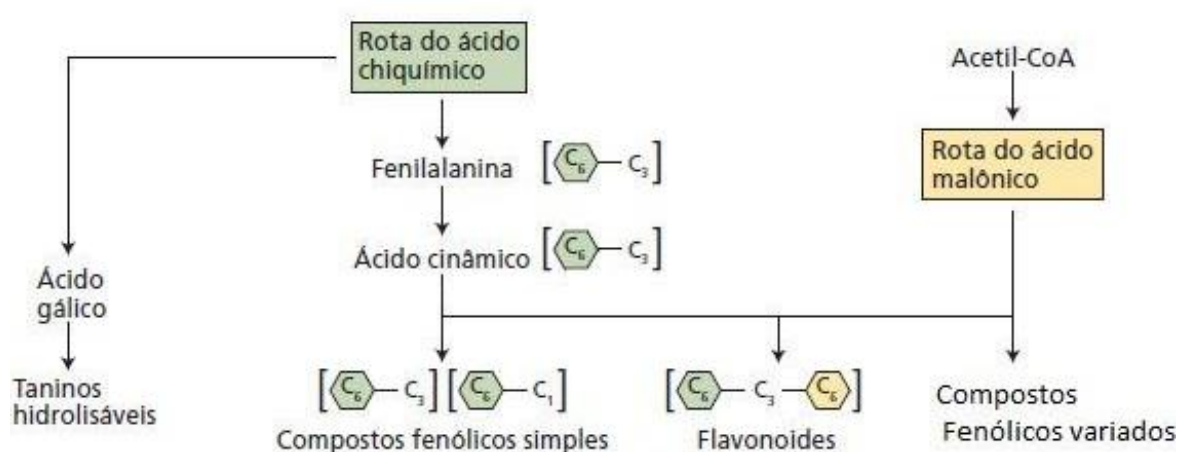
**Figura 5** – Classificação dos principais compostos fenólicos.



Fonte - Autoria própria (2024).

A biossíntese dos compostos fenólicos Figura 7, nas plantas ocorre principalmente através da via do ácido chiquímico que leva à produção de fenilalanina, um precursor chave para muitos fenólicos. A fenilalanina é transformada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em ácido cinâmico, que é um ponto de partida para a formação de uma variedade de compostos fenólicos (Liu *et al.*, 2019). Além disso, o caminho dos poliketídeos é crucial para a biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. A complexidade das vias metabólicas permite uma vasta diversidade de compostos fenólicos, cada um com funções e propriedades específicas (Wu *et al.*, 2021).

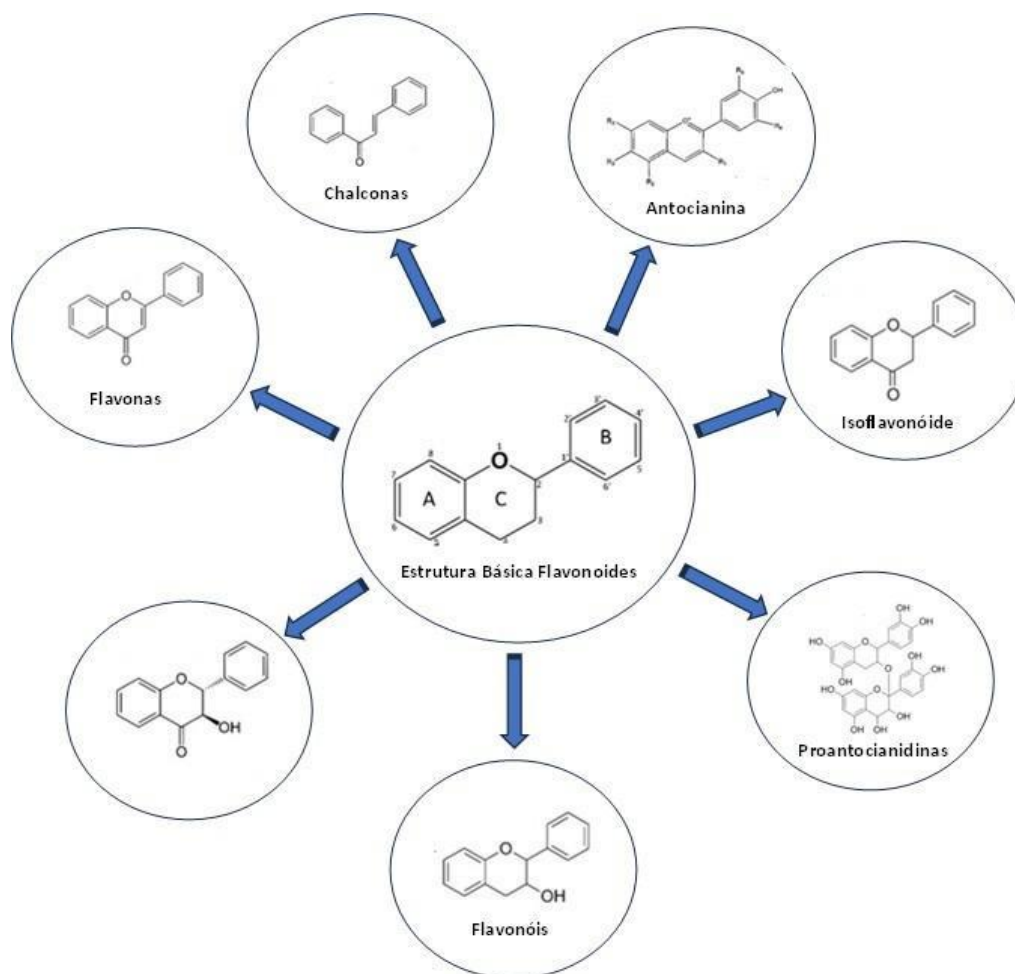
**Figura 7** - Rota metabólica da biossíntese de compostos fenólicos nos vegetais.



Fonte: Adaptado de Taiz, 2024.

Os compostos fenólicos são metabólitos especiais amplamente distribuídos no reino vegetal, conhecidos por desempenharem diversas funções essenciais na planta. Estruturalmente, a complexidade varia desde simples moléculas, como o ácido gálico, até estruturas poliméricas Figura 8, como as ligninas. Sua presença está associada a uma série de funções, incluindo defesa contra herbívoros e patógenos, proteção contra radiação UV e papel antioxidante (Yang *et al.*, 2018).

**Figura 8 – Estrutura e classificação dos flavonóides.**



Fonte - Autoria própria (2024).

## 2.4 Extração de Compostos Fenólicos Bioativos

Métodos convencionais como maceração e percolação são amplamente usados, porém, apresentam diversas desvantagens. O uso elevado de solventes orgânicos não apenas aumenta os custos, mas também impacta negativamente o meio ambiente. Além disso, esses métodos demandam longos períodos de extração e apresentam baixa eficiência, resultando em extrações incompletas dos compostos desejados (Dzah *et al.*, 2020; Fu *et al.*, 2019).

Os métodos tradicionais também são limitados pela baixa solubilidade dos compostos fenólicos em solventes comumente utilizados. Muitas vezes, as altas temperaturas necessárias para extrair esses compostos podem degradar os compostos bioativos, reduzindo sua extração. Ademais, a necessidade de grandes volumes de solventes tóxicos aumenta os riscos à saúde e ao meio ambiente (Shirsath *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2020).

Para superar essas limitações, métodos alternativos têm sido desenvolvidos. Técnicas como a extração assistida por ultrassom (UAE) e a extração assistida por micro-ondas (MAE) são promissoras. Essas técnicas oferecem maior eficiência, menor consumo de solventes e tempos de extração reduzidos. Na UAE as bolhas de cavitação geradas melhoram a transferência de massa entre o solvente e o analito presente na amostra, resultando em extrações mais rápidas e eficientes (Palma *et al.*, 2013; Chemat *et al.*, (2017). Além disso, essas técnicas podem operar em temperaturas mais baixas, preservando a integridade dos compostos fenólicos (Dzah *et al.*, 2020).

Outros métodos como a extração com fluidos supercríticos (SFE) com solventes eutéticos profundos (DES) também têm ganhado destaque. A SFE utiliza dióxido de carbono supercrítico, que é um solvente não tóxico e sustentável, para extrair compostos bioativos de forma eficiente. A DES, por sua vez, oferece uma alternativa verde aos solventes tradicionais, utilizando combinações de componentes naturais para dissolver compostos fenólicos de maneira eficaz (Mai *et al.*, 2020; Cunha e Fernandes, 2018). Essas abordagens inovadoras não só aumentam a eficiência da extração, mas também reduzem os impactos ambientais, alinhando-se às demandas por processos mais sustentáveis.

A Extração Assistida por Micro-ondas (MAE) é um método que utiliza radiação micro-ondas para aquecer a matriz sólida e o solvente, facilitando a liberação de compostos fenólicos. As vantagens da MAE incluem tempos de extração significativamente reduzidos e maior eficiência de extração devido ao aquecimento volumétrico uniforme e rápido. No entanto, as desvantagens incluem a necessidade de equipamentos especializados e a possível degradação de compostos termo-sensíveis. Variáveis como a potência das micro-ondas, tempo de exposição e tipo de solvente influenciam a eficiência da extração.

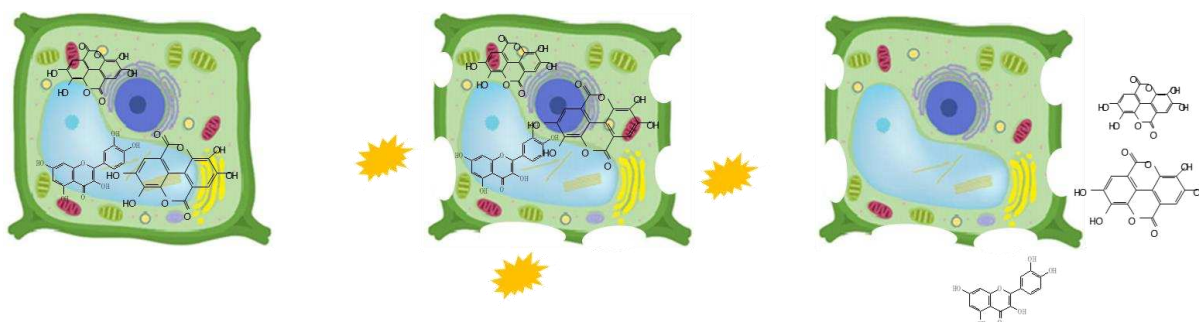
Na Extração por Fluido Pressurizado (PLE) envolve a utilização de solventes a altas pressões e temperaturas, aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos fenólicos. Este método é vantajoso por ser mais rápido e eficiente que a extração convencional, além de permitir a utilização de solventes verdes. As desvantagens incluem o custo elevado dos equipamentos e o controle rigoroso das condições operacionais. Fatores como temperatura, pressão e tipo de solvente são críticos para a eficiência da extração.

Já na Extração por Fluido Supercrítico (SFE) utiliza fluidos em estado supercrítico, geralmente CO<sub>2</sub>, para a extração de compostos fenólicos. Este método é vantajoso por ser não-tóxico e permitir uma separação eficiente dos compostos-alvo devido às propriedades tunáveis do fluido supercrítico. As desvantagens incluem o alto custo dos equipamentos e a necessidade de condições operacionais precisas. A eficiência da SFE é afetada por variáveis como pressão, temperatura, e co-solventes utilizados.

A Extração Assistida por Ultrassom (UAE) utiliza ondas ultrassônicas para aumentar a permeabilidade celular e acelerar a liberação de compostos fenólicos. Suas principais vantagens incluem a redução do tempo de extração e do consumo de solventes, além da possibilidade de operar em temperaturas mais baixas, preservando compostos termo sensíveis. No entanto, a UAE pode causar degradação de compostos sensíveis devido à cavitação intensa e ao aumento local de temperatura (Chemat et al., 2017). A eficiência da UAE é influenciada por fatores como a amplitude ultrassônica, a temperatura, o tempo de extração e a natureza do solvente utilizado.

O mecanismo de ação é baseado no fenômeno de cavitação Figura 9, que ocorre quando a pressão em um líquido diminui a ponto de formar pequenas bolhas ou cavidades que colapsam violentamente. Gerada pelo ultrassom, a cavitação aumenta significativamente a transferência de massa, acelerando a dissolução e difusão dos compostos fenólicos das células vegetais para o solvente. Este efeito é amplamente estudado em diversos materiais vegetais, mostrando que a técnica pode reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente necessária, além de melhorar a eficiência da extração de compostos termossensíveis, como os polifenóis (Kaltsa et al., 2020).

**Figura 9**– Fenômeno de cavitação, causando ruptura de estruturas vegetais.



Fonte - Autoria própria (2024).

Estudos recentes demonstram que a escolha do solvente e suas concentrações são cruciais para a eficácia da extração ultrassônica. Por exemplo, a combinação de etanol e água tem se mostrado particularmente eficaz para a extração de isoflavonas de materiais vegetais, otimizando os rendimentos de extração são realizados por parâmetros como potência do ultrassom e temperatura do processo (Tzanova *et al.*, 2020). Em um estudo sobre a extração de compostos fenólicos de flores de sabugueiro, a utilização de solventes eutéticos profundos combinados com pré-tratamento ultrassônico resultou em maiores rendimentos de polifenóis totais (Kaltsa *et al.*, 2020).

Outro fator importante na extração ultrassônica é a relação entre o tamanho das partículas do material vegetal e a eficiência da cavitação. Partículas muito grandes podem dificultar a penetração do solvente, enquanto partículas muito pequenas podem não se beneficiar totalmente dos efeitos da cavitação. Estudos indicam que um tamanho de partícula otimizado maximiza a recuperação de compostos bioativos (Chaves *et al.*, 2020). Além disso, a configuração experimental como a razão sólido/solvente e a frequência do ultrassom precisam ser cuidadosamente ajustadas para evitar a degradação térmica dos compostos fenólicos durante a extração (Xinyu *et al.*, 2023).

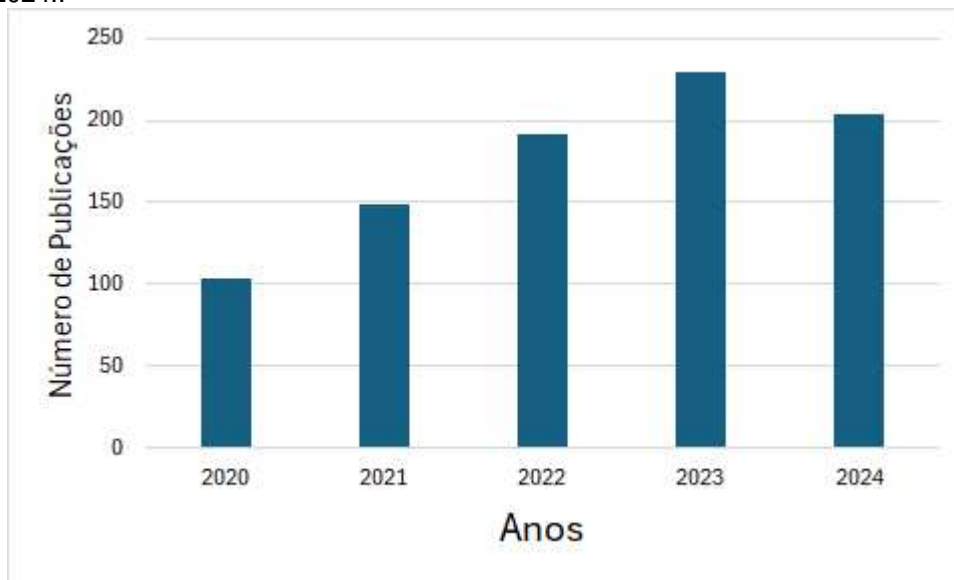
A extração por banho ultrassônico tem se mostrado promissora na extração eficiente de compostos fenólicos presentes em diferentes matrizes vegetais com menos tempo, boa eficiência e sustentabilidade.

## **2.5 Solventes Eutéticos Profundos(DES) e Solventes Eutéticos Naturais Profundo (NADES)**

Os solventes eutéticos Figura 10 profundos (DES - Deep Eutectic Solvents) e os solventes eutéticos naturais profundos (NADES - Natural Deep Eutectic Solvents) são conceitos relacionados, mas apresentam diferenças significativas em sua composição e propriedades. Enquanto os solventes eutéticos profundos (DES) são formados pela combinação de dois ou mais componentes, que podem incluir substâncias naturais ou sintéticas, como açúcares, ácidos carboxílicos e compostos amônicos, os NADESs são uma subcategoria específica que se refere exclusivamente à combinação de componentes naturais, sem a necessidade de incluir solventes orgânicos sintéticos.



**Figura 11** – Publicações sobre NADESs no período de 2020 a 2024 na base de dados Scopus até junho de 2024..



Fonte - Autoria própria (2024).

Em termos de composição, os solventes eutéticos profundos naturais podem ser formados por uma variedade de substâncias como ácidos graxos, óleos essenciais, álcoois, terpenos e outros compostos orgânicos encontrados em plantas e outros materiais naturais. A pesquisa de (Choi *et al.*, 2021) destaca a importância da composição específica desses solventes na determinação de suas propriedades físicas e químicas, influenciando sua eficácia em diferentes aplicações de extração e dissolução.

As características distintivas dos solventes eutéticos profundos naturais incluem não apenas seu ponto de fusão reduzido, mas também sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e potencial renovável, como apontado por estudos de (Dong *et al.*, 2022). Além disso, a pesquisa de (Li *et al.*, 2023) ressalta a capacidade desses solventes de solubilizar uma variedade de compostos orgânicos e sua capacidade de penetrar profundamente em substratos sólidos, possibilitando ampla aplicação na indústria, como a extração de produtos naturais, processamento de alimentos, produção de cosméticos e farmacêuticos, entre outros.

A caracterização físico-química dos NADES desempenha um papel crucial na compreensão de suas propriedades e na otimização de seu desempenho em processos de extração. Pesquisas recentes, como as realizadas por (Chen *et al.*, 2020), têm se concentrado em investigar as propriedades termodinâmicas e cinéticas dos NADES, bem como, sua interação com os compostos alvo durante o processo de

extração. Essa caracterização é essencial para garantir a eficiência e a seletividade dos NADES em aplicações práticas.

O estudo de (Panic' et al.,2020) destaca a eficácia dos NADE na extração de polifenóis de subprodutos agroalimentares, ressaltando sua capacidade de promover a extração seletiva de compostos bioativos, minimizando o uso de solventes convencionais e proporcionando processos mais sustentáveis (Panic' et al., 2020).

Além disso, revisões recentes sobre solventes eutéticos profundos oferecem uma compreensão mais ampla de suas propriedades fundamentais e aplicações em diversas áreas, incluindo a química analítica e a indústria alimentícia. Os trabalhos de (Abbott et al.,2011) e (Dai et al.,2017) fornecem uma visão abrangente dos fundamentos dos NADE, suas características físico-químicas e uma revisão crítica de suas aplicações em diferentes contextos, incluindo a extração de compostos bioativos de matrizes complexas (Abbott et al., 2011; Dai et al., 2017).

A aplicação dos NADES na extração de compostos polifenólicos de subprodutos agroalimentares destaca-se não apenas pela eficiência na extração, mas também pela sua natureza sustentável. Esses solventes oferecem vantagens significativas em termos de baixa toxicidade, biodegradabilidade e origem renovável, tornando-os uma alternativa promissora aos solventes convencionais. Além disso, a capacidade dos NADE de formar interações específicas com os compostos alvo permite uma extração mais seletiva, resultando em extratos de maior pureza e potencial bioativo (Panic' et al., 2020).

Em suma, o uso dos solventes eutéticos profundos naturais (NADES) representa uma abordagem promissora e sustentável para a extração de compostos polifenólicos de subprodutos agroalimentares. Sua eficiência na extração seletiva de compostos bioativos, aliada à sua baixa toxicidade e origem renovável, torna-os uma alternativa atrativa aos solventes convencionais. Além disso, a combinação de NADE com tecnologias assistidas oferece uma estratégia inovadora para a valorização de subprodutos agroalimentares e a produção de extratos ricos em compostos bioativos (Panic' et al., 2020; Abbott et al., 2011; Dai et al., 2017).

## 2.6 Otimização de Procedimentos de Extração

A otimização, em química analítica, é um procedimento utilizado para a escolha de condições que levem à obtenção da melhor resposta analítica, podendo esta ser máxima ou mínima, em função das variáveis que influenciam o sistema.

A otimização pode ser realizada de duas maneiras: através de metodologia univariada que só permite otimizar uma variável por vez acerca da resposta analítica, o que requer maior tempo, e não leva em consideração as possíveis interações entre as variáveis do podendo ser negligenciadas algumas variáveis importantes, que por sua vez, podem influenciar a resposta do procedimento analítico levando a interpretações equivocadas sobre as melhores condições de operação do sistema ou através de metodologia multivariada, na qual todas as variáveis de uma única vez são otimizadas. A estratégia de otimização multivariada é mais rápida que a univariada, possibilitando a obtenção de mais informações utilizando menor quantidade de experimentos além de levar em consideração as interações entre as variáveis que podem afetar o sistema.

O planejamento para a otimização de um sistema pode ser realizado através de um estudo preliminar das variáveis do sistema, e o resultado vai conduzir a formulação do planejamento seguinte. Este tipo de estratégia é utilizada quando não se possui muito conhecimento sobre os domínios experimentais a serem estudados.

A triagem das variáveis, pode ser conduzida utilizando um planejamento fatorial completo de dois níveis. Este método avalia a influência de múltiplas variáveis independentes ( $n$ ) e suas interações em um experimento. Um estudo fatorial completo permite identificar as variáveis mais significativas que afetam a eficiência de extração, economizando tempo e recursos (Goupy; Creighton, 2020). Contudo, à medida que o número de variáveis aumenta, o número de experimentos necessários cresce exponencialmente, tornando-se impraticável para sistemas complexos.

A metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é uma ferramenta quimiométrica usada para modelar e otimizar processos. A RSM permite a construção de modelos matemáticos que descrevem a resposta de um sistema em função de várias variáveis independentes e suas interações (Myers *et al.*, 2016). Esta metodologia é vantajosa por proporcionar uma compreensão detalhada do

comportamento do sistema, permitindo a identificação de condições por operações ótimas.

Dentre as técnicas de RSM, pode-se citar o planejamento fatorial de três níveis ( $3^k$ ), o desenho composto central, o Box-Behnken e a matriz de Doehlert (Oliveira *et al.*, 2010).

O planejamento fatorial completo de três níveis,  $3^k$ , pode ser utilizado para a obtenção de um modelo quadrático, porém, este tipo de desenho é mais recomendado para um número reduzido de fatores, pois com um  $K$ , muito grande, será necessário um número elevado de experimentos para descrever o modelo.

O Planejamento Composto Central (CCD) é um tipo específico de RSM que combina um planejamento fatorial  $2^n$  com pontos axiais e centrais, permitindo uma estimativa precisa das relações quadráticas entre as variáveis. O CCD é útil na otimização da extração de compostos fenólicos, pois pode explorar eficientemente a superfície de resposta com um número relativamente pequeno de experimentos (Montgomery, 2019). As vantagens do CCD incluem a capacidade de identificar interações entre variáveis e obter um modelo preciso com menos experimentos comparado a outros métodos. No entanto, pode ser custoso e trabalhoso, especialmente em experimentos que exigem condições controladas rigorosamente.

O planejamento Box-Behnken é uma técnica de desenho experimental amplamente utilizada em otimização de processos. Desenvolvido para responder a variáveis múltiplas com um número reduzido de experimentos, ele é especialmente útil em contextos onde os custos ou o tempo para experimentação são elevados. Essa técnica permite a avaliação de interações entre variáveis com um número menor de experimentos comparado ao planejamento fatorial completo, sendo frequentemente aplicada em áreas como engenharia química, farmacêutica e ciências dos materiais para otimizar formulações e processos de produção (Sagarika *et al.*, 2018; Munoz-Jimenez *et al.*, 2020).

Complementar ao Box-Behnken, a matriz de Doehlert também é utilizada para otimização de processos, destacando-se pela flexibilidade de distribuição dos pontos experimentais. A matriz de Doehlert é projetada para otimizar experimentos em regiões irregulares, estudar as variáveis em diferentes níveis e permite uma exploração mais detalhada das condições experimentais com menor número de ensaios. Suas aplicações são diversas, incluindo otimização de processos

bioquímicos e extração de compostos bioativos, destacando-se por sua capacidade de explorar eficientemente o espaço experimental e gerar modelos preditivos robustos (Srinivas *et al.*, 2020; Basheer; Alsharaa, 2019). A vantagem principal da matriz de Doehlert é sua capacidade de ajustar-se a limites diferentes para cada variável, oferecendo maior precisão em experimentos complexos.

Para o planejamento de misturas é utilizado quando a composição das variáveis é mais relevante que a quantidade absoluta, o que é comum na formulação de solventes para extração de compostos fenólicos. Este método considera as proporções relativas das componentes da mistura e como elas influenciam a resposta (Cornell, 2011). As principais vantagens incluem a capacidade de otimizar formulações complexas e desenvolver novas misturas de solventes com propriedades desejadas. No entanto, a modelagem de misturas pode ser complexa e exige um bom entendimento das interações entre os componentes, além de um número considerável de experimentos para gerar dados robustos.

## **2.7 Química Verde**

A química verde, também conhecida como química sustentável, é uma abordagem que busca minimizar o impacto ambiental e melhorar a eficiência dos processos químicos. A Química Verde é definida como o design de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso e a geração de substâncias perigosas (Anastas; Warner, 1998). Os 12 Princípios da Química Verde, formulados por Anastas e Warner, orientam a prática dessa ciência, destacando a prevenção de resíduos, a maximização da economia atômica, o uso de matérias-primas renováveis e a diminuição da toxicidade dos produtos e processos (Anastas *et al.*, 2020).

Os solventes verdes desempenham um papel crucial na química verde, substituindo solventes orgânicos voláteis e tóxicos por alternativas mais sustentáveis e menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Exemplos de solventes verdes incluem água, etanol, glicerol, líquidos iônicos e solventes derivados de biomassa (Clark *et al.*, 2018). A utilização desses solventes não só reduz os riscos associados à manipulação e descarte de substâncias perigosas, mas também pode melhorar a eficiência dos processos químicos, resultando em menores custos operacionais e menor impacto ambiental.

Técnicas analíticas como extração por ultrassom, micro-ondas e líquidos pressurizados são amplamente utilizadas para reduzir o uso de solventes e energia

em processos químicos. A extração por ultrassom utiliza ondas sonoras de alta frequência para acelerar a liberação de compostos desejados de matrizes sólidas ou líquidas, aumentando a eficiência do processo (Khan *et al.*, 2019). A irradiação por micro-ondas aquece seletivamente os reagentes e solventes, reduzindo o tempo de reação e a quantidade de energia necessária. Além disso, a extração com líquidos pressurizados, também conhecida como extração com fluidos pressurizados, utiliza solventes à alta pressão e temperatura para melhorar a solubilidade e a difusão de compostos alvo, resultando em extrações mais rápidas e eficientes (Ramos *et al.*, 2020).

Essas técnicas analíticas não apenas aumentam a eficiência e a sustentabilidade dos processos, mas também têm implicações significativas na redução do consumo de solventes e energia, contribuindo para uma química mais verde. Ao implementar essas tecnologias, a química analítica se alinha aos princípios da química verde, promovendo métodos que são simultaneamente econômicos, eficazes e ambientalmente responsáveis. O desenvolvimento contínuo e a aplicação dessas técnicas inovadoras são fundamentais para a transição para práticas mais sustentáveis na ciência química (Pandey *et al.*, 2020).

### 2.7.1 Métricas Verde

As métricas verdes no programa AGREE para a determinação de uma análise verde Figura 12 incluem o uso de solventes naturais, a implementação de extrações assistidas por ultrassom ou micro-ondas e o consumo energético total do processo. A definição dessas métricas verdes envolve a avaliação do impacto ambiental dos métodos e materiais utilizados em diretrizes clínicas, promovendo práticas que minimizem danos ao meio ambiente. Os solventes naturais, como água e NADES, são preferidos sobre solventes orgânicos tóxicos, enquanto as técnicas de extração assistidas visam reduzir o uso de solventes e a energia necessária, melhorando a sustentabilidade geral do processo (González-Álvarez *et al.*, 2021).

**Figura 12** - Representação do AGREE alinhado com os 12 princípios da Química Analítica Verde.

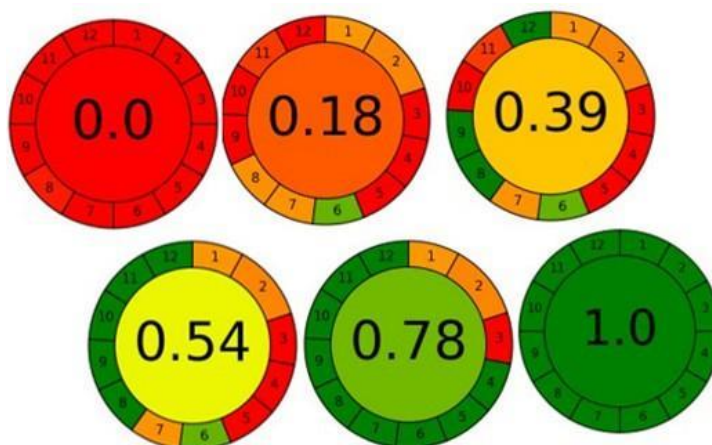


Fonte - Autoria própria (2024).

Os itens analisados nas métricas verdes do programa AGREE abrangem a eficiência do uso de solventes naturais, a eficácia das extrações assistidas e a avaliação do consumo energético. A eficiência do uso de solventes naturais é medida pela substituição de solventes sintéticos por alternativas menos tóxicas e mais sustentáveis. A eficácia das extrações assistidas é avaliada pela redução do tempo e da quantidade de solventes utilizados, enquanto o consumo energético é examinado pela quantidade de energia necessária para completar os processos. Entre esses itens, o uso de solventes naturais e o consumo energético têm um impacto significativo, pois diretamente influenciam a pegada ecológica das diretrizes (Zhou *et al.*, 2022).

O diagrama de cores utilizado na análise verde do programa AGREE facilita a visualização da conformidade ambiental das diretrizes. A cor Verde indica conformidade total com práticas sustentáveis, como uso eficiente de solventes naturais e baixo consumo energético. Amarelo sugere conformidade parcial, destacando áreas que precisam de melhorias, como a eficiência das extrações assistidas. Vermelho aponta não conformidade, indicando práticas que precisam ser reformuladas para atender aos padrões de sustentabilidade. Esse sistema de cores Figura 13 permite uma rápida identificação dos aspectos que necessitam de atenção, promovendo uma abordagem mais focada na implementação de práticas sustentáveis (Li *et al.*, 2020).

**Figura 13** – interpretação das referências à cor do AGREE.



Fonte: Métricas de Química Analítica Verde (AGREE) (REZENDE *et al.*, 2021).

Segundo Johnson et al. (2020), na revista *Journal of Cleaner Production*, a implementação de métricas verdes permite uma análise quantitativa e qualitativa das práticas ambientais, facilitando a identificação de áreas críticas e a proposição de melhorias. Além disso, as métricas verdes proporcionam uma base comparativa que pode ser utilizada para avaliar a eficácia de diferentes abordagens e políticas de sustentabilidade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico verde para a extração e determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado ao Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a proporção dos componentes do NADES LGH, e as condições de extração dos compostos fenólicos nas amostras de própolis através do design experimental *simplex centroid*;
- Otimizar as condições da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos nas amostras de própolis mediante metodologia de superfície de resposta;

- Validar o método analítico desenvolvido;
- Caracterizar os solventes eutéticos sintetizados;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de própolis, verde, vermelha e marrom;
- Avaliar a sustentabilidade do método desenvolvido através das métricas verdes;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram metanol Sigma-Aldrich de grau cromatográfico HPLC, ácido acético, marca Sigma-Aldrich, apresentando pureza de 99 - 100%, Ácido Lático-L, marca Synth, 85% P.A.-A.C.S., reagente de Folin Ciocalteu Conc 1,98 % Dens 1,24 - Marca Êxodo e água deionizada obtida a partir de um sistema de ultra-purificação Milli-Q (São Paulo, Brasil). Os padrões de compostos fenólicos utilizados foram: Ácido Siríngico, Ácido cafeico, Rutina, Ácido Vanílico, Ácido sinápico, Ácido *p*-cumárico, Ácido ferúlico, Ácido gálico, Ácido *trans*-cinâmico, Ácido clorogênico, Ácido d-hidroxibenzoico e Catequina da marca Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), todos com grau de pureza superior a 95%, D-(+)-glicose (dextrose) anidra (P.A.-A.C.S.). As soluções estoque: Ácido Siríngico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Cafeico (1mg L<sup>-1</sup>), Rutina (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Vanílico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Sinápico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido *p*-Cumárico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Felúrico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Gálico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido *trans*-Cinâmico (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido Clorogênico (1mg L<sup>-1</sup>), Quercetina (1mg L<sup>-1</sup>), Ácido d-Hidroxibenzoico (1mg L<sup>-1</sup>), Catequina (1mg L<sup>-1</sup>) e Ácido Elágico (1mg L<sup>-1</sup>) foram preparadas em uma mistura de metanol:água na proporção de (1:1). E posteriormente diluídas em soluções padrões com diferentes valores de concentração e solução de tricloreto de alumínio a 2%.

### 4.2 Instrumentos

HPLC, Agilent 1290, equipado com detectores DAD (Detector de Arranjo de Diodo), auto-amostrador (ASI-100) e bomba Quaternária. Foi utilizado uma coluna SUPELCO C18, modelo ZOBAX ODS, com dimensões de 25cm x 4,6mm x 5µm. O sinal analítico foi monitorado e a área dos picos presentes nos cromatogramas foi integrada utilizando o software EZChrom. Espectrofotômetro Digital Kasvi com Faixa Visível de 325 à 1020nm. Viscosímetro SVM 3000 Stabinger Anton Paar, rotacional com geometria cilíndrica

### 4.3 Coleta das amostras

A própolis, da espécie *Apis mellifera*, foi coletada no apiário localizado na Universidade Federal do Recôncavo - UFRB, em Cruz das Almas, Bahia, a qual pertence ao Grupo de Pesquisa Insecta. Após coleta, as amostras foram acondicionadas em um recipiente apropriado e refrigeradas a -5°C.

#### **4.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais utilizando reagente de Folin- Ciocalteu.**

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito e adaptado por Singleton e Rossi (1965). Realizaram-se diluições seriadas para as concentrações estabelecidas de 1 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido gálico. O ensaio foi realizado em triplicata, com tubos Falcon de 15 mL. As alíquotas desejadas para as concentrações de ácido gálico foram retiradas da solução-mãe de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Em seguida, adicionaram-se cerca de 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu em cada tubo e completou-se com água ultrapura até atingir um volume total de 15 mL. A solução foi deixada reagindo no escuro por 8 minutos. Posteriormente, acrescentaram-se 600  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20%, e a solução permaneceu no escuro por 1 hora.

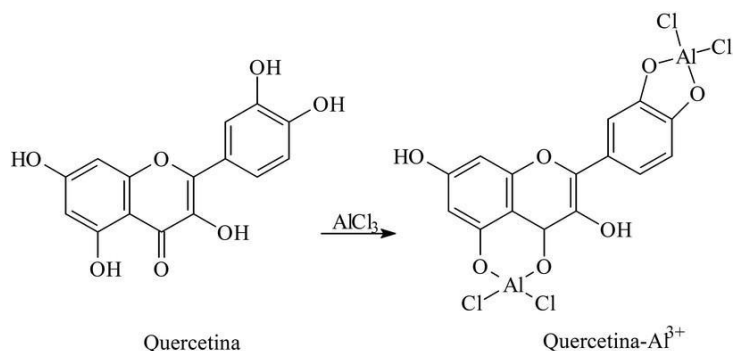
Para o branco, foram realizadas as mesmas etapas descritas anteriormente, exceto pela adição da solução de ácido gálico, que serve como referência. A leitura foi realizada usando um espectrofotômetro UV-Visível (UV/Visível 190-1100 Nm, Bivolt Kasv) com comprimento de onda em 765 nm.

#### **4.5 Determinação do teor de compostos Flavonoides totais por espectrofotometria**

A determinação de flavonoides totais pelo método Dowd adaptado por (Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat e Legret, 1994) é uma técnica colorimétrica que envolve a formação de um complexo estável entre flavonóides e cloreto de alumínio (Figura 14). Onde a quercetina é utilizada como padrão para a determinação de flavonoides totais por várias razões, que são fundamentadas tanto em suas propriedades químicas quanto na sua representatividade como flavonoide.

O conteúdo total de flavonóides foi determinado usando 0,1 mL do extrato de própolis, adicionado a 14,5 ml de água ultrapura e em seguida 0,4 ml de 2% de tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Labosi, Paris, França), completando-se com água ultrapura até atingir o volume final de 15 mL. As leituras foram realizadas em absorção a 415 nm após 30 min.

**Figura 14** – Reação Quercetina com alumínio.



Fonte - Autoria própria (2024).

Na reação, o íon alumínio Al<sup>3+</sup> se complexa com as moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonoide-Al<sup>3+</sup> de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra. (Silva, 2015). A concentração de flavonoides totais nas amostras foi expressa em equivalentes de quercetina ( mg mL<sup>-1</sup> de solução de extrato).

Esta metodologia adaptada permite a quantificação de flavonoides totais em extratos vegetais, fornecendo dados sobre o conteúdo antioxidante das amostras analisadas.

## 4.6 Otimização da síntese dos NADESs e extração dos compostos fenólicos

### 4.6.1 Planejamento de misturas

A fim de otimizar a proporção dos componentes na síntese do NADES LGH, um planejamento de mistura com restrição foi performedo, através de simplex centroid, estudando-se os componentes ácido láctico, glicose e água. Foram realizadas réplicas do ponto central para avaliação do erro experimental e a função de desejabilidade foi utilizada como resposta quimiométrica, e os sinais analíticos normalizados para fenólicos e flavonóides totais foram usados como resposta analítica.

Os NADESs foram codificados da seguinte maneira: NADES (3) com composição molar de 1:0,14:10 (L:G:H), e NADES (M) com composição molar de 5:1:9 (L:G:H), e NADES(M)<sub>mod</sub> com proporção de 1:10 (NADES(M) : H<sub>2</sub>O).

#### 4.6.2 Otimização de extração compostos fenólicos

Na otimização do procedimento de extração dos compostos fenólicos e flavonoides, utilizou-se a matriz Doehlert como estratégia de superfície de resposta para determinar os pontos críticos dos fatores volume do NADES (com proporções otimizadas) e tempo de sonicação variando de 1,5 a 5,0 mL e 20 a 80 min, respectivamente. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e foi realizada triplicata do ponto central para avaliar o erro experimental. A desejabilidade foi utilizada com estratégia quimiométrica (Equação 1) para normalização das respostas de concentração em mg g<sup>-1</sup> de flavonoides e fenólicos totais obtidos. A Desejabilidade Global (D) (Akteke-Öztutk *et al.*, 2019). A D foi calculada conforme mostrado na Equação 1:

$$di(x) = \begin{cases} 0 & \text{se } x = \text{MiSA} \\ [(x - \text{MiSA}) \cdot (\text{MaSA} - \text{MiSA})^{-1}] & \text{se } \text{MiSA} < x < \text{MaSA} \\ 1 & \text{se } x = \text{MaSA} \end{cases} \quad (\text{Eq.1})$$

Na qual, MiSA é o menor e MaSA e o maior sinal analítico obtido, e  $di(x)$  é a função de desejabilidade individual para cada resposta  $x$ , admitindo valores entre 0 e 1, nos quais  $x = 0$  é uma resposta indesejável e  $x = 1$  é uma resposta desejável. Dado que cada resposta é transformada em funções desejabilidade, eles são combinados em uma função única através de uma média geométrica, sendo esta a desejabilidade global (D). O software Statistica 7.0 ® program (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para aplicação estatística, versão para windows.

### 4.7 Determinação de Compostos fenólicos bioativos por HPLC-DAD

#### 4.7.1 Preparo das amostras para análise

Os extratos foram filtrados com membrana de polipropileno com 0,22 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro.

#### 4.7.2 Análise Cromatográfica

Foi utilizado um HPLC DAD com fase móvel composta por dois tipos de solvente (A e B), sendo o solvente A composto por uma mistura de metanol:ácido acético:água na proporção de (5:2:93), e o solvente B composto por uma mistura de água:ácido acético:metanol na proporção de (10:2:88), posteriormente foram filtradas a vácuo utilizando papel filtro quantitativo com 7,0 centímetros de diâmetro, gramatura 80g/m<sup>2</sup> e em seguida sonicadas por 20 minutos, a fim de remover os gases dissolvidos. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o gradiente empregado encontra-se descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** – Gradiente de eluição empregado no HPLC.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	100	0
10	85	15
15	70	30
30	70	30
60	50	50

Fonte: Autoria própria (2024).

A detecção foi realizada nos seguintes comprimentos de onda:  $\lambda = 260$  nm,  $\lambda = 272$  nm,  $\lambda = 280$  nm,  $\lambda = 310$  nm e  $\lambda = 330$  nm.

#### 4.8 Algoritmo AGREE

O algoritmo AGREE (Analytical GREENness Metric Approach) é uma ferramenta desenvolvida para avaliar a sustentabilidade ambiental de métodos analíticos, incorporando os doze princípios da Química Analítica Verde. Cada princípio, que inclui a prevenção de resíduos, minimização do consumo de energia e redução do uso de reagentes tóxicos, é avaliado e recebe uma pontuação de 0 a 1. Essas pontuações são combinadas para fornecer uma métrica geral de sustentabilidade, representada visualmente por um gráfico em formato de relógio. Essa estrutura permite identificar áreas que podem ser otimizadas para reduzir impactos ambientais, promovendo práticas laboratoriais mais ecológicas (Pena-Pereira *et al.*, 2020).

O funcionamento do AGREE envolve a aplicação de critérios quantitativos para cada princípio da GAC, considerando fatores como a toxicidade dos reagentes,

quantidade de resíduos gerados, requisitos de energia e etapas do procedimento. As pontuações são calculadas automaticamente pelo software AGREE, resultando em uma pontuação única que reflete a sustentabilidade geral do método analítico. A ferramenta permite personalização dos pesos atribuídos a cada princípio, garantindo flexibilidade e adaptabilidade a diferentes contextos. O AGREE tem mostrado resultados promissores na avaliação e melhoria da sustentabilidade de métodos analíticos, sendo essencial para laboratórios comprometidos com a redução do impacto ambiental (Pena-Pereira *et al.*, 2020).

#### **4.9 Algoritmo AGREEprep**

O algoritmo AGREEprep (Analytical Greenness Metric for Sample Preparation) é uma ferramenta projetada para avaliar a sustentabilidade ambiental das técnicas de preparação de amostras, etapa crucial em procedimentos analíticos. Desenvolvido para preencher a lacuna na avaliação da “verdura” das etapas de preparação, o AGREEprep baseia-se em dez princípios da preparação de amostras verdes (Green Sample Preparation - GSP). Esses princípios incluem a escolha e uso de solventes e reagentes, geração de resíduos, consumo de energia, tamanho da amostra e rendimento. Cada um dos dez princípios recebe uma pontuação de 0 a 1, que são então combinadas para fornecer uma avaliação geral da sustentabilidade do método de preparação de amostras. A visualização dos resultados é facilitada por um gráfico em formato de relógio, que apresenta de forma clara e intuitiva as áreas que podem ser otimizadas para reduzir o impacto ambiental (Pena-Pereira *et al.*, 2022).

O seu funcionamento se dá aplicando critérios quantitativos para cada um dos dez princípios da GSP. Estes critérios abrangem desde a toxicidade e quantidade de reagentes utilizados até a eficiência energética e minimização de resíduos gerados. As pontuações são calculadas automaticamente pelo software AGREEprep, resultando em uma métrica que reflete a sustentabilidade global do método de preparação de amostras. O algoritmo permite também a personalização dos pesos atribuídos a cada princípio, de acordo com a relevância específica no contexto do método analítico avaliado. Essa flexibilidade assegura que o AGREEprep possa ser adaptado a diferentes cenários e necessidades analíticas, promovendo práticas mais sustentáveis em laboratórios de todo o mundo.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Solventes Eutéticos Naturais Profundos**

Foram preparados três Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES). O primeiro, nomeado como NADES (M) com composição molar de 5:1:9 (L:G:H) Choi, (2016). O segundo, denominado de NADES (3) com composição molar de 1:0,14:10 (L:G:H), possui a mesma composição do NADES (M), entretanto as proporções dos componentes foram otimizadas a fim de obter a máxima extração de compostos fenólicos. Em seguida, foi realizada uma diluição, o NADES (Md), a partir da proporção 1:10 de NADES (M) e água.

Para confirmar essa suspeita, foram realizadas buscas em bases de dados científicas dos últimos quatro anos, as quais demonstram que quanto maior a quantidade de água no NADES, maior sua eficiência de extração. Essa correlação está bem documentada na literatura recente (Silva, 2020; Pereira, 2021; Oliveira, 2022).

Após a síntese, os NADES devem apresentar-se como solventes líquidos, homogêneos e estáveis, sem a formação de precipitado em temperatura ambiente e pressão atmosférica, o que os tornam adequados para o uso como solventes na etapa de preparo de amostra. Além disso, a ocorrência de interações intermoleculares, envolvendo ligações de hidrogênio, é uma característica da formação de NADES, já evidenciada em trabalhos anteriores.

### **5.2 Otimização da proporção dos componentes do NADES LGH**

Na otimização da proporção dos componentes da síntese do NADES LGH, foi utilizado um simplex centrado. Os experimentos foram realizados segundo a matriz de mistura com restrição apresentada na Tabela 3. Regressão de mínimos quadrados foi utilizada para ajustar modelos linear, quadrático e cúbico especial a desejabilidade global calculada em função das proporções dos componentes da mistura. Uma ANOVA foi realizada para testar a significância dos modelos ajustados.

**Tabela 3** - Matriz de planejamento Doehlert com 2 fatores, desejabilidade individual e desejabilidade global.

Exp.	Ácido Lático (mL)	Glicose (mL)	Água (mL)	Desejabilidade individual		Desejabilidade Global
				Flavonoides totais	Fenólicos totais	
1	0,800	0,100	0,100	0,185	0,263	0,220
2	0,100	0,800	0,100	0,000	0,000	0,000
3	0,100	0,100	0,800	1,000	1,000	1,000
4	0,450	0,450	0,100	0,028	0,094	0,051
5	0,450	0,100	0,450	0,263	0,306	0,284
6	0,100	0,450	0,450	0,038	0,286	0,104
7	0,333	0,333	0,333	0,040	0,201	0,089
8	0,567	0,217	0,217	0,085	0,188	0,126
9	0,217	0,567	0,217	0,020	0,212	0,065
10	0,217	0,217	0,567	0,213	0,557	0,344

Fonte - Autoria própria (2024).

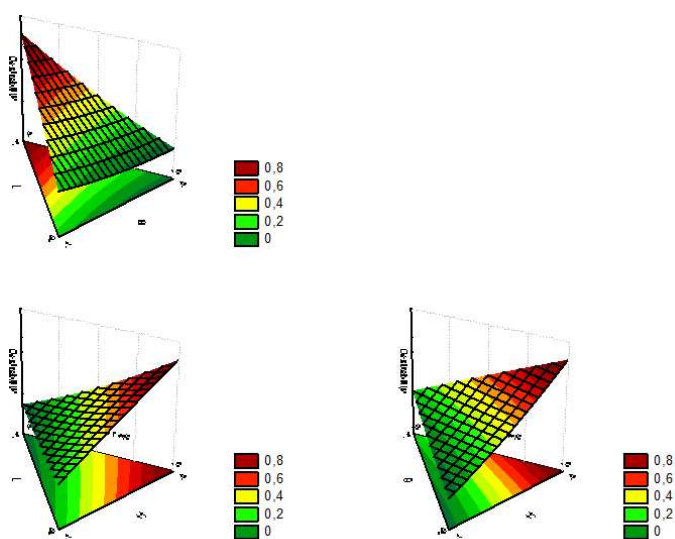
O modelo linear ajustado a variável dependente (desejabilidade global) apresentou um valor calculado de F para um nível de confiança de 95% ( $F_{2,7}$ ) de 9,62 > 6,54 e  $p = 0,01 < 0,05$  indicando que este modelo é estatisticamente significativo. Ao ajustar o modelo quadrático a matriz estudada, há uma melhora significativa no ajuste do modelo, pois o valor de F calculado para um nível de confiança de 95% ( $F_{2,4}$ ) passa a ser de 30,34 > 10,65 e  $p = 0,003 < 0,05$ . No entanto, ajustando os modelos cúbicos especiais não há melhora significativa no ajuste da superfície ( $F_{1,3} = 0,45 < 17,44$  e  $p = 0,55 > 0,05$ ). Assim, pode-se concluir que o modelo quadrático proporciona um ajuste adequado aos dados.

A equação obtida pelo modelo quadrático foi:  $SA = 0,22(L) + 0,02(G) + 0,98(H) - 0,19[(L)(G)] - 1,34[(L)(H)] - 1,57[(G)(H)] + 1,08[(L)(G)(H)]$ , na qual SA é o sinal analítico, L, G e H, o volume de ácido lático, glicose e água, respectivamente.

A Figura 15 apresenta as superfícies de resposta geradas para o planejamento de mistura com restrição performado. A superfície de resposta obtida apresenta um

ponto de sela, logo suas coordenadas não devem ser usadas como pontos críticos na otimização do sistema. Dessa forma, para determinar as melhores condições experimentais foi realizada uma inspeção visual, como descrito anteriormente. As condições estabelecidas foram: 1,5g de ácido láctico, 0,51g de glicose e 3,816μL de água.

**Figura 15** - Gráfico de Superfície de resposta em três dimensões do planejamento de mistura.



Fonte - Autoria própria (2024).

### 5.3. Otimização do procedimento de extração

A fim de obter as condições experimentais ótimas do procedimento de extração de fenólicos e flavonóides utilizando o NADES LGH 5:1:9 molar, para a otimização foi realizada uma matriz Doehlert como metodologia de superfície de resposta. Foram estudados os fatores de tempo de sonicação e volume de NADES de acordo com a matriz apresentada a Tabela 4.

**Tabela 4** - Matriz de planejamento Doehlert com 2 fatores, desejabilidade individual e desejabilidade global.

Exp.	Volume NADES (mL)	Tempo Sonicação (min)	Desejabilidade individual		Desejabilidade de Global
			Conc. Fenólicos (mg g <sup>-1</sup> )	Conc. Flavonoides (mg g <sup>-1</sup> )	
1	5,0	35	0,61	0,00	0,00
2	5,0	65	0,00	0,06	0,00
3	3,25	20	0,26	0,09	0,15
4	3,25	80	0,83	0,83	0,83
5	1,5	35	0,48	0,33	0,40

					(Conclusão)
6	1,5	65	0,88	1,00	0,94
7 (PC)	3,25	50	1,00	0,55	0,74
8 (PC)	3,25	50	0,92	0,37	0,59
9 (PC)	3,25	50	0,59	0,31	0,43

Fonte - Autoria própria (2024).

O modelo quadrático foi ajustado aos dados (falta de ajuste:  $p = 0,75 > 0,05$  e  $F = 0,14 < F_{1,2} = 18,51$ ) e equação que relaciona os fatores de volume de NADES e tempo de sonicação com as concentrações de flavonoides e fenólicos totais é  $\text{Concentração (mg g}^{-1}\text{)} = 0,58 - 0,66(\text{VolumeNADES}) - 0,45(\text{VolumeNADES})^2 - 0,32(\text{TempoSonicação}) - 0,05(\text{TempoSonicação})^2 - 0,30 (\text{VolumeNADES})(\text{TempoSonicação})$ . A derivação desta equação em termos de volume de NADES e tempo de sonicação resulta no seguinte sistemas de Equações 2 e 3:

$$\frac{\partial \text{Concentração}}{\partial \text{VolumeNADES}} = -0,9 - 0,9 \text{VolumeNADES} - 0,66 - 0,3 \text{TempoSonicação} - 0,66$$

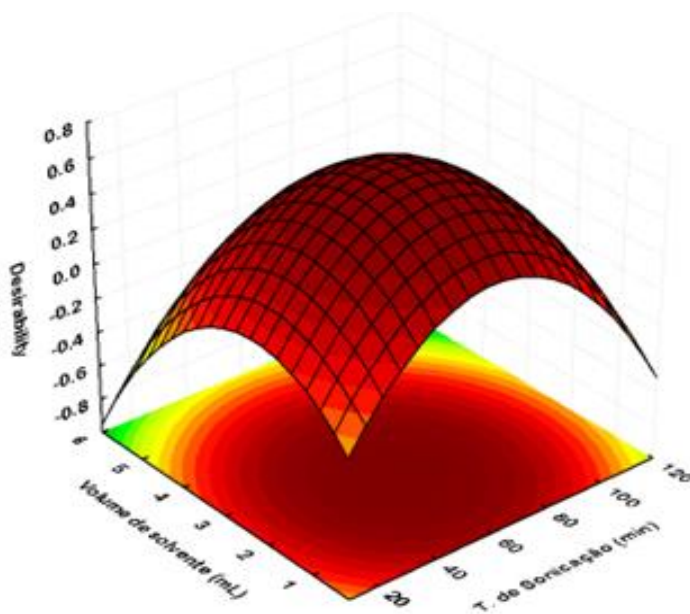
(Eq. 2)

$$\frac{\partial \text{Concentração}}{\partial \text{TempoSonicação}} = -0,3 - 0,1 \text{VolumeNADES} - 0,32 - 0,1 \text{TempoSonicação} - 0,32$$

(Eq. 3)

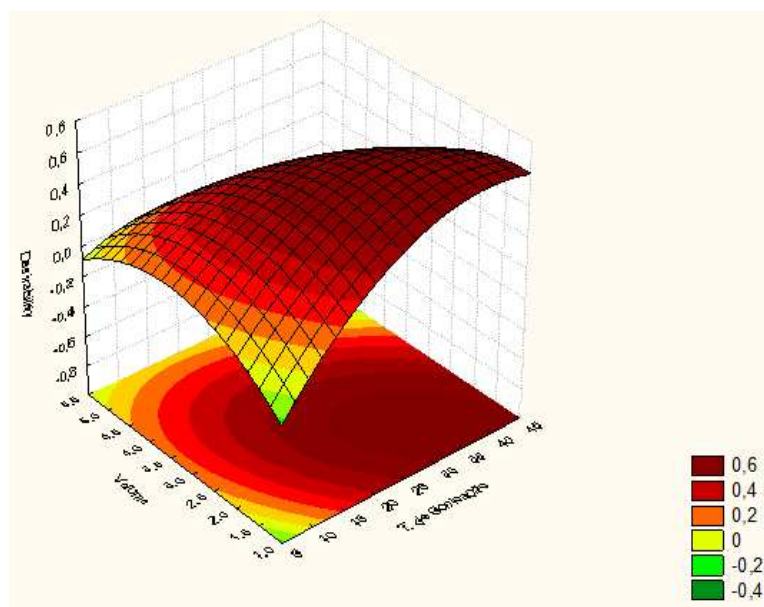
Os resultados do sistema de equações indicam um ponto máximo na superfície de resposta Figura 16 e 17; assim, foi usado para determinar as condições críticas, segundo Moreira et al. 2018. A partir dos resultados obtidos na etapa de otimização, as condições ótimas estabelecidas no procedimento foram: Volume de NADES de 2,3 mL e tempo de sonicação de 59 min, como pode ser observado no perfil desejabilidade apresentado na Figura 18 e 19. Nestas condições, o NADES (3) mostrou ser eficaz devido à sua composição e condições de extração otimizadas que favorecem a solubilização dos compostos fenólicos e flavonoides.

**Figura 16.** Superfície de resposta para otimização dos fatores de volume de NADES (3) e tempo de sonicação.



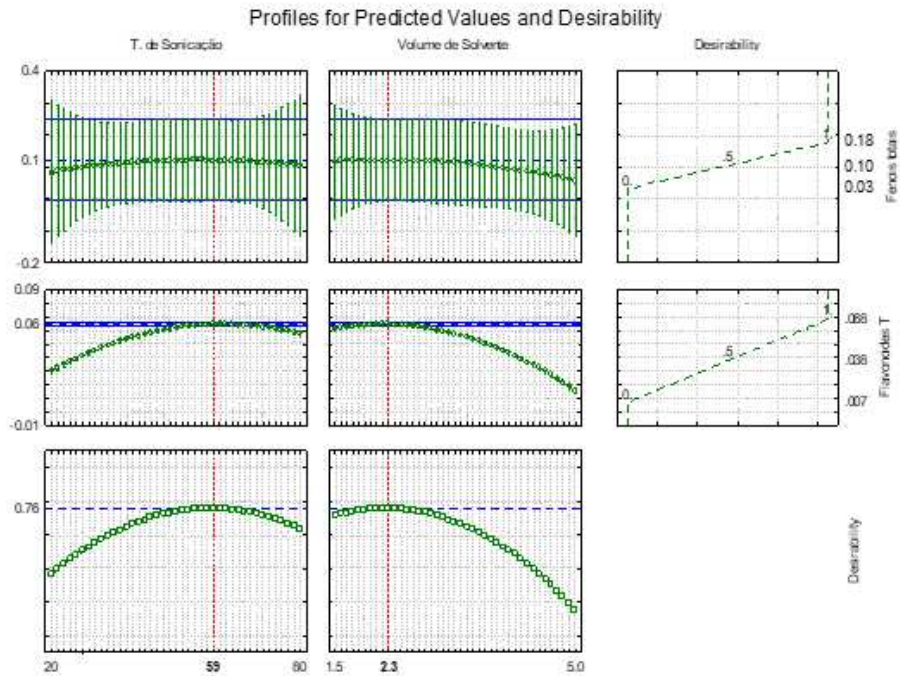
Fonte - Autoria própria (2024).

**Figura 17.** Superfície de resposta para otimização dos fatores de volume de NADES (M) e tempo de sonicação



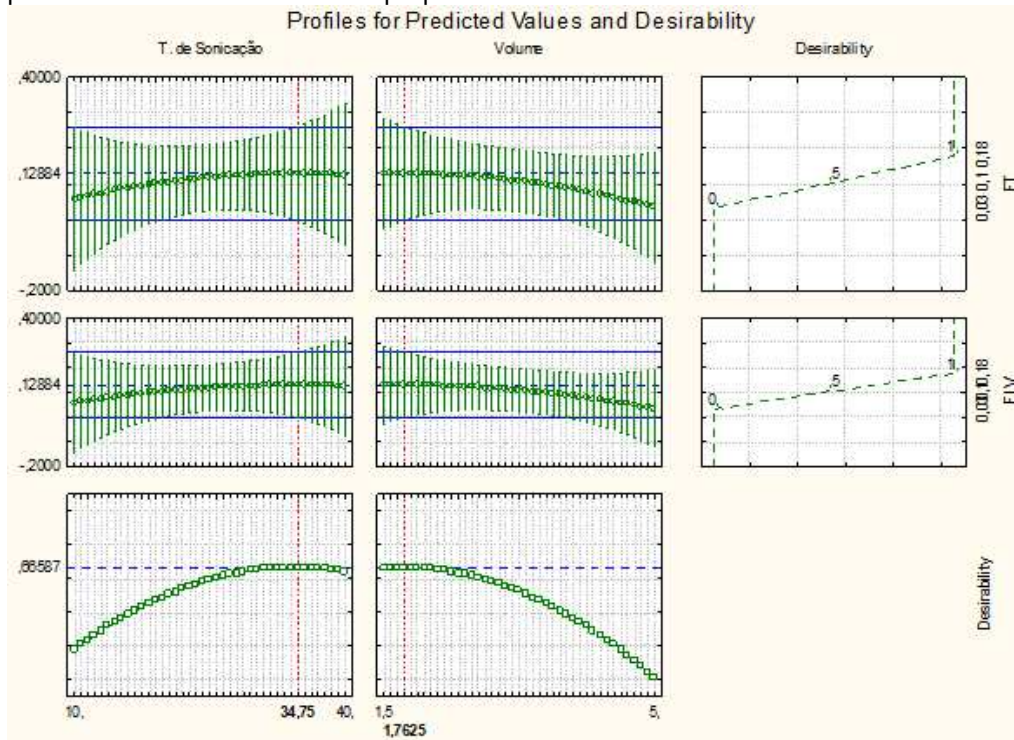
Fonte - Autoria própria (2024).

**Figura 18.** Perfil desejabilidade NADES (3) na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de própolis.



Fonte - Autoria própria (2024).

**Figura 19.** Perfil desejabilidade NADES (M) na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de própolis.



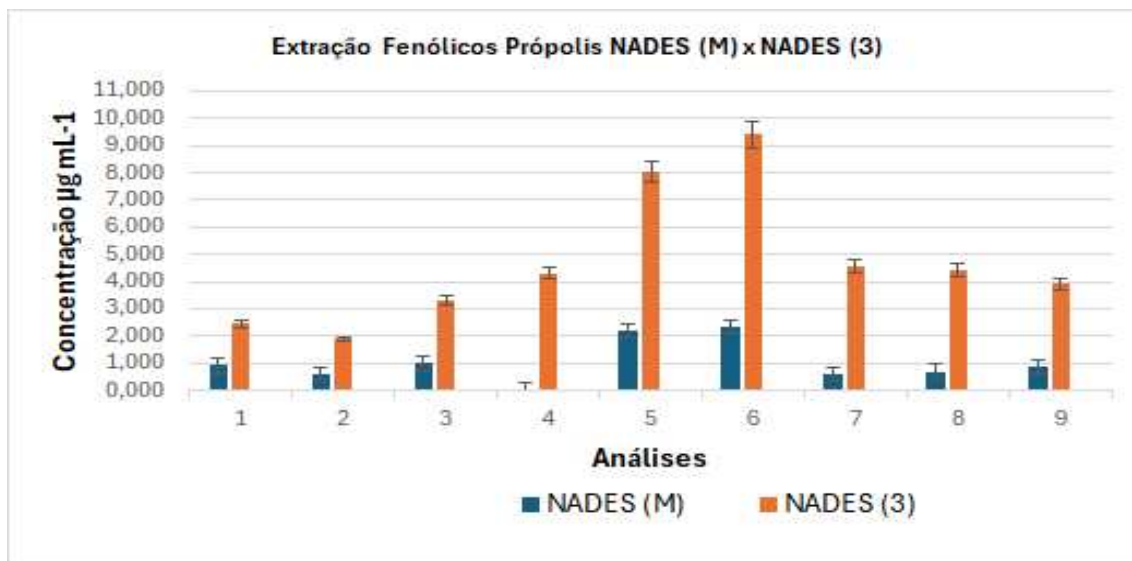
Fonte - Autoria própria (2024).

#### 5.4 Determinação do teor de compostos Fenólicos totais por espectrofotometria

A determinação de fenólicos totais em própolis utilizando ácido gálico como referência é uma metodologia empregada devido à sua eficácia e precisão. Este método se baseia na reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu, resultando em uma mudança de cor proporcional à concentração de compostos fenólicos presentes na amostra. A curva de calibração para determinação dos resultados obteve-se a equação da reta expressa por  $y = 0,0971x - 0,0157$ , em que  $y$  é a absorbância e  $x$ , a concentração de ácido gálico em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com  $R^2 = 0,9984$ .

A relevância desse método, destacando a capacidade do ácido gálico de atuar como um padrão para a quantificação de fenólicos totais, graças à sua estrutura química representativa dos fenóis encontrados em própolis (Molecules, 2023). O uso do ácido gálico é justificado pela sua alta reatividade com o reagente de Folin-Ciocalteu, resultando em uma detecção sensível e reprodutível dos fenólicos totais. A quantificação precisa de compostos fenólicos é essencial, pois eles estão diretamente relacionados às propriedades antioxidantes da própolis, contribuindo significativamente para suas aplicações terapêuticas (Gels, 2023). Além disso, a literatura científica recente reforça a eficácia do ácido gálico em comparação com outros padrões, garantindo resultados consistentes em diferentes estudos e aplicações (Molecules, 2023; Gels, 2023). Portanto, a utilização do ácido gálico como referência na determinação de fenólicos totais em própolis Figura 19 não só assegura precisão analítica, mas também valoriza a análise das propriedades bioativas do própolis.

**Figura 20** - Concentração de Fenólicos na própolis marrom com NADES.



Fonte - Autoria própria (2024).

Pode-se observar que o NADES (3) com uma maior quantidade de água, combinada com a aplicação do ultrassom, demonstrou uma maior eficiência na extração de compostos fenólicos na própolis. Esse aumento na eficiência de extração pode ser atribuído à sinergia entre as propriedades dos NADES e a ação do ultrassom (Denga *et al.*, 2023).

A presença de água melhora a difusão dos compostos fenólicos no solvente (Vázquez, 2021). A água atua como um agente dispersante, reduzindo a viscosidade do NADES e, assim, facilitando a difusão dos compostos fenólicos da matriz de própolis para o solvente. Essa melhoria na difusão é crítica para maximizar o rendimento de extração, especialmente em matrizes complexas como a própolis (Zabar; Issa; Khalil, 2018).

Outro ponto a ser considerado é que a água pode aumentar a estabilidade dos compostos fenólicos durante o processo de extração. A estabilização dos compostos fenólicos é essencial para preservar suas propriedades bioativas, como a atividade antioxidante. Solventes com alto teor de água podem evitar a degradação dos compostos fenólicos durante a extração, resultando em extratos de maior qualidade (Yang *et al.*, 2020).

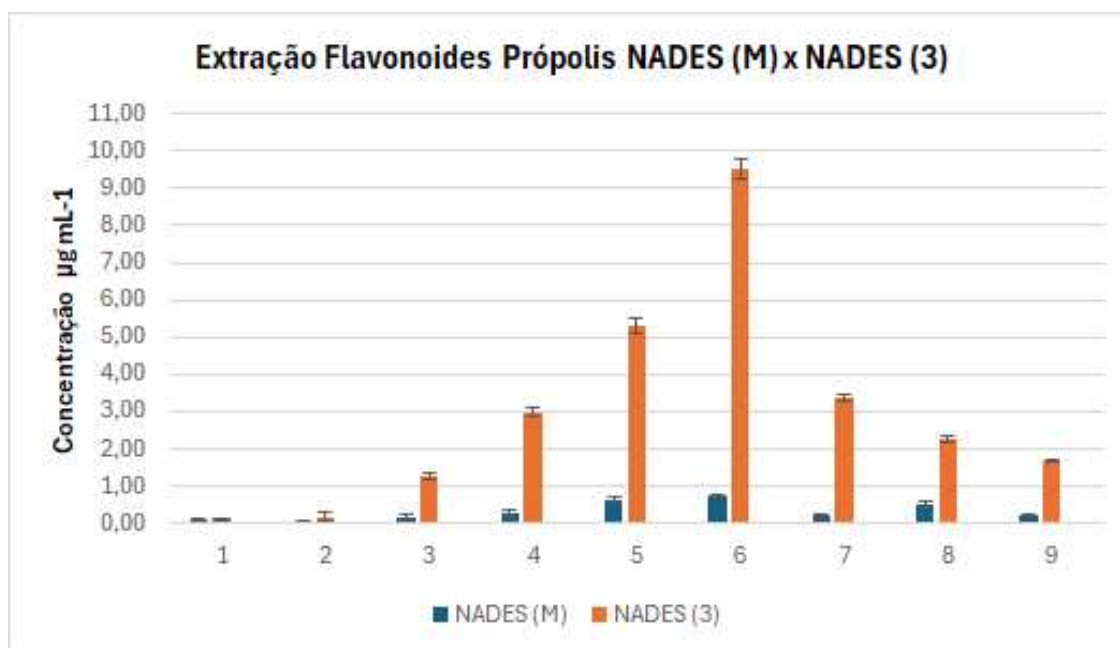
Portanto, a utilização de NADES com maior quantidade de água, em conjunto com a aplicação de ultrassom, se justifica pela maior polaridade, melhor difusão e estabilização dos compostos extraídos, resultando em uma eficiência de extração significativamente aumentada.

### **5.5 Determinação do teor de compostos Flavonoides totais por espectrofotometria**

A determinação de flavonoides totais em própolis utilizando o método de cloreto de alumínio é amplamente reconhecida pela sua simplicidade e eficácia. Este método baseia-se na formação de um complexo entre o cloreto de alumínio e os flavonóides, que pode ser quantificado por espectrofotometria. A reação resulta em um complexo amarelo, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra. Pesquisas realizadas com diferentes tipos de própolis mostram variações na concentração de flavonoides, influenciadas pela origem botânica e geográfica da amostra. O método do cloreto de alumínio é preferido devido à sua reprodutibilidade, permitindo a comparação consistente entre diferentes estudos e amostras (Kasote *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022).

Para a determinação dos flavonoides totais, foi utilizada a curva de calibração ilustrada na Figura 20. A equação da reta obtida foi expressa por  $y = 0,0266x - 0,0035$ , onde  $y$  representa a absorbância e  $x$  a concentração de quercetina em  $\mu\text{g/mL}$ , com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9997.

**Figura 21** - Concentração de Flavonóides na própolis marrom com NADES (M) e NADES (3).



Fonte - Autoria própria (2024).

Na figura 16, os experimentos de 5 a 6 revelaram que o NADE (3) foi mais eficaz na extração de flavonoides, apresentando um teor significativamente maior desses compostos bioativos em comparação com o NADE (M). Essa eficiência pode ser atribuída às propriedades específicas do NADE (3), como sua capacidade de solubilizar compostos polares e sua maior eficiência em penetrar na matriz de própolis (Skarpalezos; Detsi, 2019).

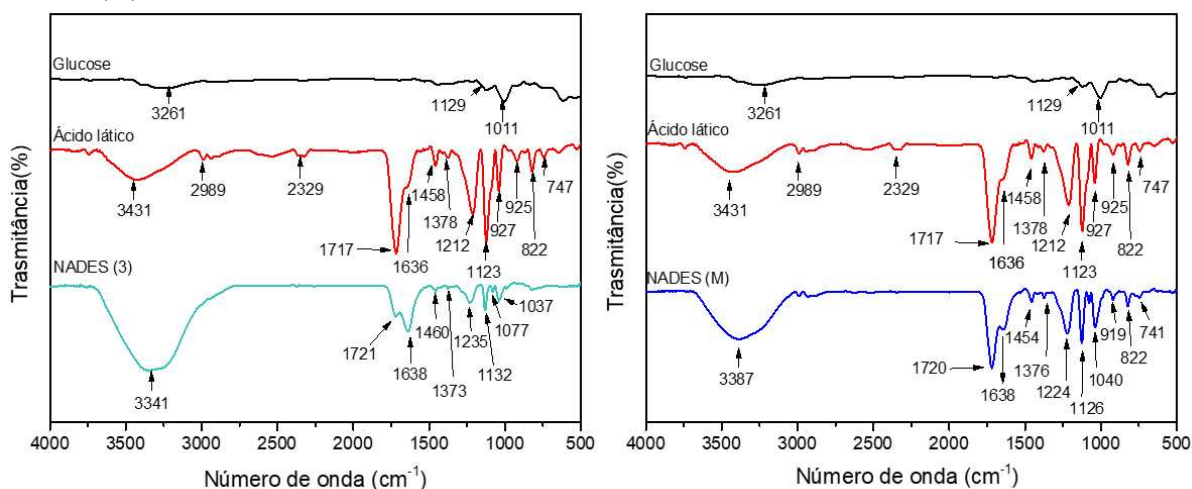
A água, quando combinada com outros componentes eutéticos, aumenta a polaridade do solvente, o que é crucial para a extração de flavonoides, que são compostos predominantemente polares. Além disso, a presença de água pode ajudar na quebra das interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, permitindo uma liberação mais eficiente dos flavonoides da matriz de própolis (Jantan; Mun'im, 2021). Essa maior eficiência é corroborada por estudos que mostram que a adição de água aos solventes eutéticos naturais melhora significativamente o rendimento da extração de compostos bioativos (Tsiaka *et al.*, 2023).

## 5.6 Caracterização dos NADES

### 5.6.1 Análise por ATR FTIR

A ATR FTIR é uma técnica analítica que permite a caracterização de compostos químicos pela identificação de suas frequências vibracionais. A Figura 21, apresenta as curvas de transmitância de glicose, ácido láctico e NADESs, sendo o NADES (M) o de referência e o NADES (3) o desenvolvido, evidenciando as diferentes bandas de absorção que refletem suas estruturas moleculares únicas. A glicose, por exemplo, mostra um pico proeminente em  $3361\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramentos O-H, além de bandas em  $1129\text{ cm}^{-1}$  e  $1011\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a estiramentos C-O e C-OH. Estas bandas são típicas de carboidratos, conforme observado em estudos recentes (Garcia *et al.*, 2019).

**Figura 22** – Espectros (FTIR) dos componentes puros — ácido láctico, ---- Glicose, — NADES (3) — NADES (M).



Fonte - Autoria própria (2024).

O ácido láctico, por outro lado, exibe um padrão de absorção distinto, com um pico significativo em  $2989\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a estiramentos C-H, e uma banda em  $1723\text{ cm}^{-1}$  atribuída a estiramentos C=O, além de um pico em  $1373\text{ cm}^{-1}$  que representa deformações C-H. Esses resultados são consistentes com estudos prévios que detalham as características espectrais do ácido láctico (Kumar *et al.*, 2020). Comparando com a glicose, observa-se que o ácido láctico apresenta uma estrutura

vibracional variada (Tabela 5), refletindo suas propriedades químicas e interações intermoleculares distintas.

**Tabela 5** - ATR FTIR substâncias isoladas e NADES formados.

Composto	Número de ondas (cm <sup>-1</sup> )										
Ácido Láctico	3431	2989	2329	1717	1458	1378	1212	927	925	822	747
Glucose	3431	1129	1011								
NADES(3)	3341	1721	1638	1460	1373	1235	1132	1077	1037		
NADES (M)	3387	1720	1638	1454	1376	1224	1126	1040	919	822	741

Fonte - Autoria própria (2024).

O NADES (3) apresenta padrões espectrais que diferem substancialmente dos componentes puros. O NADES (M) mostra picos em 1720 cm<sup>-1</sup>, 1476 cm<sup>-1</sup> e 1224 cm<sup>-1</sup>, indicando interações entre seus componentes, que afetam as frequências vibracionais dos grupos funcionais. A presença de bandas em regiões semelhantes às do ácido láctico sugere que este é um dos componentes do NADES (M), porém os deslocamentos observados indicam novas interações intermoleculares. De acordo com Dai et al. (2021), os NADESs são conhecidos por alterar as propriedades físico-químicas dos componentes individuais, criando sistemas mais estáveis e eficientes para diversas aplicações.

O NADES (3) exibe um perfil de absorção próximo, com bandas notáveis em 3387 cm<sup>-1</sup> e 1040 cm<sup>-1</sup>, sugerindo uma composição e interações intermoleculares semelhante ao NADES (M) de referência. As diferenças nas frequências vibracionais entre os dois NADES indicam que, embora ambos contenham ácido láctico, a composição e a natureza das interações intermoleculares não variam tão significativamente. Isso é consistente com a capacidade dos NADES de formar diferentes estruturas eutéticas baseadas nas proporções e nos tipos de compostos envolvidos (Rodriguez *et al.*, 2019).

Em síntese, a análise por ATR FTIR revela informações importantes sobre a estrutura e as interações moleculares dos compostos estudados. A comparação entre glicose, ácido láctico e os NADESs demonstram diferenças significativas nas frequências vibracionais, evidenciando as distintas composições e interações intermoleculares. Estas observações são fundamentais para a compreensão do

comportamento dos NADESs em aplicações práticas, como solventes verdes.

A análise de FTIR dos NADES (3) e NADES (M) demonstra claramente a formação dos solventes eutéticos através das interações de hidrogênio entre a glicose, o ácido lático e a água. As mudanças nas bandas espectrais indicam a formação de um novo composto molecular, confirmando a síntese do NADES (3).

### 5.6.2 Viscosidade

A caracterização dos Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES) é crucial para compreender suas propriedades físicas e químicas, que impactam diretamente na sua eficiência na extração de compostos bioativos. Um dos parâmetros significativos na caracterização dos NADES é a viscosidade, que afeta a difusão das moléculas e, conseqüentemente, a cinética da extração. Os dados obtidos (Tabela 6), mostram variações substanciais nas viscosidades dinâmica e cinética entre os diferentes tipos de NADES utilizados.

**Tabela 6** - Parâmetros físicos NADES (M) e NADES (3)

Parâmetros Físicos	NADES (M)	NADES (3)
Viscosidade dinâmica (mPa.s)	28,37	2,35
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> /s)	23,18	2,15
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,22	1,09
Temperatura (°C)	25	25

Fonte - Autoria própria (2024).

No contexto dos experimentos realizados, observa-se que a viscosidade dinâmica do NADES (M) é significativamente maior (28,37 mPa.s) quando comparada ao NADES (3) (2,35 mPa.s) e ao NADES Modificado (1,16 mPa.s). A viscosidade dinâmica reflete a resistência ao fluxo dos solventes sob uma força aplicada, indicando que o NADES (M) possui uma estrutura molecular mais densa ou maior interação intermolecular. De acordo com Chen et al. (2021), a alta viscosidade dos NADES pode ser atribuída à formação de redes de ligação de hidrogênio, que aumentam a coesão molecular. Essa característica do NADES (M) pode influenciar negativamente a difusão dos flavonoides, tornando o processo de extração menos eficiente em

comparação com os NADES de menor viscosidade.

A viscosidade cinética, que é a relação entre a viscosidade dinâmica e a densidade, também apresenta variações. O NADES (M) possui uma viscosidade cinética de 23,18 mm<sup>2</sup>/s, enquanto o NADES (3) e o NADES modificado têm valores de 2,15 mm<sup>2</sup>/s e 1,13 mm<sup>2</sup>/s, respectivamente. Esses valores são coerentes com a densidade dos solventes, sendo o NADES (M) o mais denso (1,22 g/cm<sup>3</sup>) e o NADES modificado o menos denso (1,02 g/cm<sup>3</sup>). A menor viscosidade cinética dos NADES (3) e Modificado sugere que esses solventes são mais adequados para processos onde uma rápida difusão e menor resistência ao movimento das moléculas são desejáveis. Conforme relatado por (Smith *et al.*,2022), solventes com baixa viscosidade cinética facilitam a penetração nos materiais vegetais e a liberação de compostos bioativos, justificando os resultados observados nos experimentos de extração.

Além disso, a densidade dos NADES, que é a massa por unidade de volume, é outro fator que complementa a análise de viscosidade. A densidade mais alta do NADES (M) pode contribuir para sua maior viscosidade, conforme sugerido por Santos *et al.* (2020). A temperatura constante de 25°C utilizada nos experimentos minimiza as variações térmicas que poderiam alterar a viscosidade, assegurando que as diferenças observadas sejam intrínsecas aos solventes. Em síntese, a análise das viscosidades dinâmica e cinética dos NADES, junto com a densidade, oferece uma compreensão abrangente das propriedades físicas desses solventes, crucial para otimizar a extração de flavonoides e outros compostos bioativos.

## **5.7 Características analíticas**

A validação de métodos analíticos é essencial para garantir a qualidade dos dados gerados. Ela envolve uma série de procedimentos sistemáticos que asseguram a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos, garantindo que um método analítico funcione conforme o esperado. Segundo Zhang *et al.* (2021), esses métodos são essenciais para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. Os parâmetros analíticos utilizados para a validação incluem especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez e

estabilidade (Smith *et al.*, 2022). Esses parâmetros garantem que o método seja adequado para seu propósito e produza resultados consistentes. A seguir serão abordados os parâmetros utilizados para validar este trabalho.

As curvas analíticas foram traçadas a partir dos resultados das áreas dos picos das soluções padrões de: Ácido Vanílico, Rutina, Ácido Gálico, Ácido trans-Cinâmico, Catequina, Ácido Siríngico, d-Hidroxibenzoico, p-Cumárico, Ácido Cafeico, Ácido Clorogênico, Ácido Ferúlico e Ácido Sináptico. na faixa de concentração de 0,2 a 5,0 mgL<sup>-1</sup>. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estabelecidos por análise da curva de calibração.

#### 5.7.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em produzir resultados diretamente proporcionais às concentrações das espécies em estudo dentro de uma determinada faixa analítica.

A linearidade é frequentemente avaliada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ). Para se obter  $r$  é necessário criar uma relação matemática que possa fazer a correlação entre os sinais analíticos e soluções do analito de concentrações conhecidas. Estas relações matemáticas muitas vezes são expressas como uma equação de reta ( $y = a x + b$ ), chamada de curva de calibração.

#### 5.7.2 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é um parâmetro analítico essencial que define a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, com um nível de confiança estatística aceitável, conforme descrito pela (IUPAC, 2014).

Existem diversas abordagens para calcular o Limite de Detecção (LD) em análises químicas, sendo algumas das formas mais comuns o método do sinal ao ruído, o método da inclinação do gráfico, o método da concentração mínima mensurável e o método da variação do branco. Cada método envolve diferentes procedimentos estatísticos e experimentais para determinar o LD, seja pela relação entre o sinal analítico e o ruído de fundo, pela extrapolação da curva de calibração, pela identificação da menor concentração mensurável ou pela avaliação da variação

do branco. A escolha do método depende da técnica analítica, das características da amostra e dos critérios específicos do método de análise (Day & Downey, 2007).

O cálculo do Limite de Detecção (LD) segundo a IUPAC, utiliza a fórmula que envolve o desvio padrão dos resíduos ou da resposta em branco (DP), o coeficiente angular da curva de calibração (b), e o fator de 3,3, Equação 4.

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{b} \quad (\text{Eq. 4})$$

### 5.7.3 Limite de Quantificação (LQ)

Conforme descrito pela IUPAC, o LQ é determinado com base na menor concentração de um analito que pode ser medida com um grau de precisão e exatidão aceitáveis, geralmente definidas como um coeficiente de variação inferior a 20% e um desvio em relação ao valor nominal inferior a 20%. O LQ é calculado utilizando a Equação 5.

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{b} \quad (\text{Eq. 5})$$

No presente trabalho os valores de LD e LQ foram calculados utilizando as equações 1 e 2. Porém, como a técnica de separação cromatográficas, não foi obtido um branco analítico, para o cálculo foi então utilizado o desvio padrão do coeficiente linear. Os limites de detecção e da quantificação para o método analítico desenvolvido neste trabalho, assim como outras figuras de méritos são apresentados na Tabela 7. As curvas analíticas foram construídas utilizando soluções padrões na faixa de 0,2 a 5,0 mgL<sup>-1</sup>. A equação de regressão correspondente e outros parâmetros característicos para a determinação dos compostos fenólicos bioativos. As curvas analíticas apresentam linearidade ( $r > 0,99$ ) na faixa de concentração estudada.

**Tabela 7** - Figuras de mérito para o método utilizado na determinação de polifenóis em própolis por CLAE-DAD.

Analitos	TR <sup>a</sup>	LD <sup>b</sup>	LQ <sup>c</sup>	Curva Analítica	r
Ácido Siríngico	16,61	0,10	0,29	$Y = 4 \times 10^6 x + 1.10^6$	0,999
Ácido Cafeico	14,86	0,34	1,03	$Y = 1 \times 10^7 x - 30135$	0,996
Rutina	31,93	0,34	1,03	$Y = 2 \times 10^6 x - 100268$	0,992
Ácido Vanílico	15,24	0,48	1,58	$Y = 7 \times 10^7 x + 2 \times 10^6$	0,992
Ácido Sinápico	22,77	0,39	1,19	$Y = 2 \times 10^7 x + 2 \times 10^6$	0,995
Ácido <i>p</i> -Cumárico	19,99	0,43	1,31	$Y = 1 \times 10^7 x + 8 \times 10^6$	0,990
Ácido Ferúlico	21,71	0,46	1,40	$Y = 1 \times 10^7 x + 1 \times 10^6$	0,994
Ácido Gálico	4,46	0,09	0,31	$Y = 3.10^6 x + 408309$	0,999
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	46,14	0,41	1,25	$Y = 2 \times 10^6 x + 1392,2$	0,996
Ácido Clorogênico	21,34	0,18	0,59	$Y = 2 \times 10^7 x - 546862$	0,998
Ácido d-Hidroxibenzoico	19,66	0,35	1,06	$Y = 3 \times 10^7 x + 1 \times 10^7$	0,993
Catequina	10,57	0,24	0,72	$Y = 742006x + 370576$	0,998

a - Tempo de retenção em minutos , b - Limite de detecção em (mg L<sup>-1</sup>), c - Limite de quantificação em (mg L<sup>-1</sup>).

A faixa de limite de detecção (LD) dos fenólicos identificados, variou entre 0,09 e 0,48, estando em conformidade com os critérios estabelecidos pela (IUPAC) para análise de compostos fenólicos em amostras complexas como a própolis. Segundo os critérios da IUPAC, LDs abaixo de 0,5 são recomendados para garantir a sensibilidade analítica adequada na quantificação de fenólicos em extratos naturais. Além disso, esses valores são essenciais para assegurar a precisão e a confiabilidade dos resultados analíticos, permitindo uma caracterização detalhada dos perfis químicos dos fenólicos presentes na própolis.

#### 5.7.4 Precisão

A precisão é um parâmetro na validação de métodos analíticos, representando o grau de concordância entre medições repetidas de uma amostra sob condições especificadas. Podendo a precisão ser geralmente expressa como a variação relativa ou o desvio padrão relativo das medições (Gonzalez *et al.*, 2021). A precisão pode ser

dividida em repetibilidade e reprodutibilidade, onde a repetibilidade refere-se à consistência dos resultados em condições idênticas e a reprodutibilidade envolve variações em condições diferentes, como operadores ou equipamentos distintos (Miller *et al.*, 2022). Como é dependente da concentração do analito deve ser determinada para diferentes concentrações deste. Neste trabalho a precisão expressa como desvio padrão relativo (RSD) foi determinada para as concentrações de 1,4 e 3,8 mg L<sup>-1</sup> de cada analito Tabela 8. Os valores de RSD obtidos foram de respectivamente Ácido Siríngico, Ácido Cafeico, Rutina, Ácido Vanílico, Ácido Sinápico, Ácido *p*-Cumárico, Ácido Felúrico, Ácido Gálico, Ácido *trans*-Cinâmico, Ácido Clorogênico, Ácido d-Hidroxibenzoico e Catequina. Estes valores demonstram boa precisão do método para a determinação dos compostos fenólicos nas própolis.

**Tabela 8-** Figuras de mérito para o método precisão utilizado na determinação de compostos fenólicos bioativos em própolis por CLAE-DAD.

Analitos	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	RSD %		RSD %	
	1,4 <sup>a</sup>	3,8 <sup>b</sup>	1,4 <sup>a</sup>	3,8 <sup>b</sup>
Ácido Siríngico	4,8	7,5	9,5	6,8
Ácido Cafeico	7,9	7,5	8,0	5,8
Rutina	8,8	7,1	9,8	6,1
Ácido Vanílico	7,9	4,1	8,4	5,2
Ácido Sinápico	8,8	3,0	9,5	6,3
Ácido <i>p</i> -Cumárico	9,4	1,5	9,8	6,7
Ácido Felúrico	9,9	4,3	9,3	7,5
Ácido Gálico	6,3	4,9	9,0	9,6
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	7,2	4,1	9,5	7,2
Ácido Clorogênico	8,2	7,6	9,3	6,6
Ácido d-Hidroxibenzoico	8,7	7,1	9,1	7,1
Catequina	7,2	4,7	9,3	6,1

a e b - Concentrações em mg L<sup>-1</sup>.

### 5.7.5 Exatidão

A exatidão é um parâmetro na validação de métodos analíticos, referindo-se à proximidade entre o valor medido e o valor verdadeiro ou aceito como padrão de referência. A exatidão é avaliada através de ensaios de recuperação, onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas à matriz de amostra, e os resultados obtidos são comparados aos valores esperados (Silva *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2022). Ensaios de exatidão utilizam padrões certificados e métodos estatísticos para garantir a confiabilidade dos dados.

Para avaliar a recuperação deste método foram realizados ensaios onde uma amostra de própolis foi fortificada com solução estoque obtendo-se concentrações finais de 1,4 e 3,8 mg L<sup>-1</sup>.

### 5.7.6 Ensaio de Recuperação

O ensaio de adição e recuperação ou fator de recuperação do método (R) na validação analítica é um parâmetro utilizado para avaliar a precisão e a exatidão de métodos analíticos. Esse parâmetro envolve a adição de uma quantidade conhecida de um analito a uma matriz amostral, seguida pela recuperação e quantificação desse analito para determinar a eficiência do método analítico empregado (López-Ruiz *et al.*, 2020). As porcentagens de recuperação dos analitos próximas a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação apresente uma boa precisão. A porcentagem de recuperação pode ser calculada de acordo com a Equação 6.

$$\%R = 100 \times \left[ \frac{(C_f - C_b)}{C_a} \right] \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde C<sub>f</sub> representa a concentração encontrada, C<sub>b</sub> o valor da concentração original do analito na amostra, C<sub>a</sub> a concentração adicionada. Neste trabalho a recuperação foi avaliada considerando os limites aceitáveis para a porcentagem de recuperação 80 e 120% é possível constatar que os resultados obtidos para a avaliação da exatidão Tabela 9 que o método é exato.

**Tabela 9** - Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de própolis.

Analito	Variedade de Própolis	Conc. Amostra	Conc. Analito adicionado em mg L <sup>-1</sup>	Conc. encontrada	Rec. (%)	Conc. Reforçada	Analito adicionado ppm	Rec. (%)
Ácido Vanílico	PV	9,1	1,4	10,4	96	12,9	3,8	102
	PM	0,0	1,4	1,3	93	3,8	3,8	100
	PVL	0,0	1,4	1,2	92	3,7	3,8	98
Rutina	PV	45,6	1,4	44,2	105	48,4	3,8	111
	PM	1,2	1,4	0,0	87	3,5	3,8	93
	PVL	7,7	1,4	6,5	91	10,4	3,8	103
Ácido Gálico	PV	2,2	1,4	1,0	92	4,6	3,8	96
	PM	1,2	1,4	0,0	90	3,6	3,8	97
	PVL	5,9	1,4	4,6	99	8,6	3,8	106
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	PV	3,2	1,4	1,9	95	5,8	3,8	103
	PM	2,1	1,4	0,6	106	4,2	3,8	95
	PVL	1,8	1,4	0,5	99	4,0	3,8	92
Catequina	PV	32,4	1,4	31,0	101	34,97	3,8	104
	PM	3,1	1,4	1,8	98	5,70	3,8	103
	PVL	1,2	1,4	0,0	92	3,64	3,8	96

(continuação)

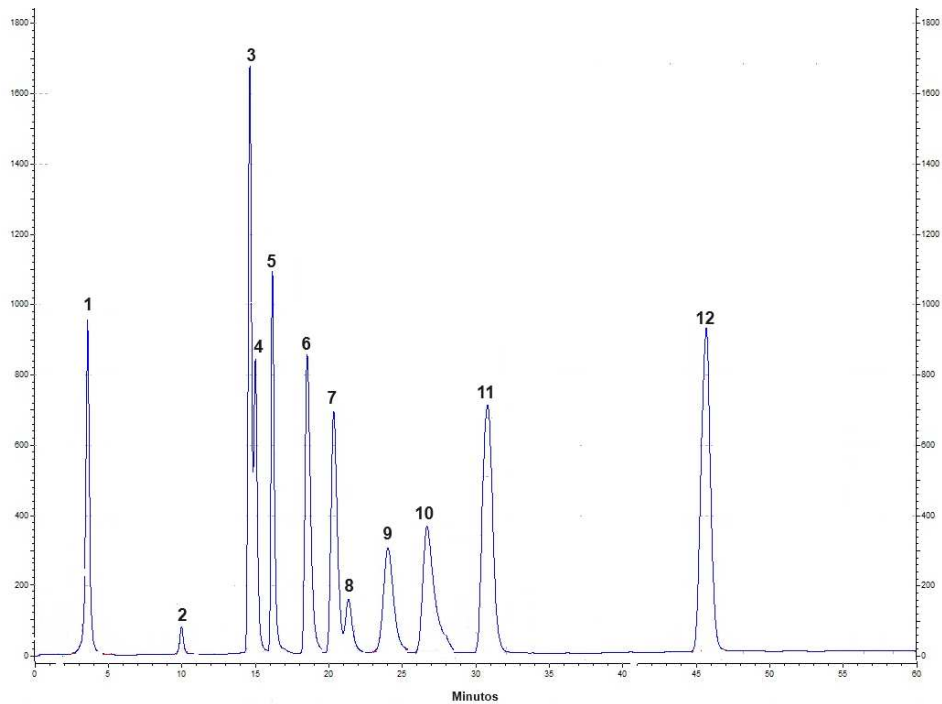
Analito	Variedade de Própolis	Conc. Amostra	Conc. Analito adicionado em mg L <sup>-1</sup>	Conc. encontrada	Rec. (%)	Conc. Reforçada	Analito adicionado ppm	Rec. (%)
Ácido Siríngico	PV	2,7	1,4	1,50	91	5,64	3,8	109
	PM	1,2	1,4	0,0	90	3,7	3,8	97
	PVL	3,6	1,4	2,4	92	6,2	3,8	101
d-Hidroxibenzóico	PV	1,3	1,4	0,0	99	3,9	3,8	105
	PM	1,2	1,4	0,0	89	3,4	3,8	91
	PVL	1,2	1,4	0,0	86	3,6	3,8	95
p-Cumárico	PV	36,1	1,4	34,9	91	39,0	3,8	108
	PM	1,2	1,4	0,0	90	3,6	3,8	97
	PVL	1,1	1,4	0,0	84	3,5	3,8	93
Ácido Cafeico	PV	18,75	1,4	17,5	89	21,4	3,8	103
	PM	1,32	1,4	0,0	94	3,6	3,8	97
	PVL	1,29	1,4	0,0	92	3,9	3,8	104
Ácido Clorogênico	PV	47,3	1,4	46,0	97	50,1	3,8	109
	PM	1,2	1,4	0,0	91	3,8	3,8	102
	PVL	1,2	1,4	0,0	90	3,7	3,8	98
Ácido Ferúlico	PV	6,04	1,4	4,80	89	8,3	3,8	94
	PM	1,17	1,4	0,00	84	3,4	3,8	90

(Conclusão)

	PVL	1,28	1,4	0,00	91	3,5	3,8	92
Ácido Sináptico	PV	1,26	1,4	0,00	90	3,61	3,8	95
	PM	1,28	1,4	0,00	91	3,46	3,8	91
	PVL	1,16	1,4	0,00	83	3,55	3,8	93

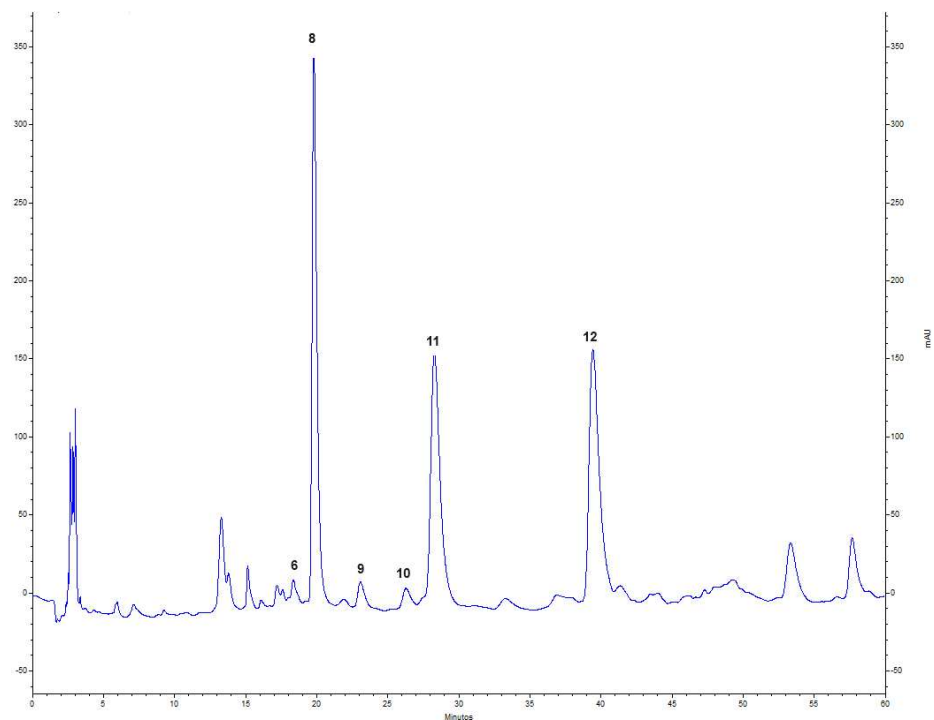
PV - Própolis Verde; PM - Própolis Marrom; PVL - Própolis Vermelha.

**Figura 16** - Cromatograma Padrões Fenólicos.



1 - Ácido Gálico; 2 - Catequina; 3 - Ácido Cafeico; 4 - Ácido Vanílico; 5 - Ácido Siríngico; 6 - Ácido d-Hidroxibenzoico; 7 - Ácido *p*-Cumárico; 8 - Ácido Clorogênico; 9 - Ácido Felúrico; 10 - Ácido Sinápico; 11 - Rutina e 12 - Ácido *trans*-Cinâmico,

**Figura 17** - Cromatograma própolis verde em comprimento de onda de 280 nm.



6 - Ácido d-Hidroxibenzoico; 8 - Ácido Clorogênico; 9 - Ácido Felúrico; 10 - Ácido Sinápico; 11 - Rutina e 12 - Ácido *trans*-Cinâmico.

A análise da própolis por HPLC-DAD, revelou 12 variedade de compostos bioativos presentes em diferentes tipos de própolis (verde, marrom e vermelha) extraídos com NADES (M), NADES (3) e NADES (Md), este último foi utilizando como parâmetro para a verificação da presença de diferentes tipos de água, especialmente a água livre e a água de hidratação, em comparação com outros NADES. O estudo concentrou-se na identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides, cujas concentrações foram determinadas em  $\text{mg L}^{-1}$ . A metodologia utilizada permitiu a obtenção de resultados significativos que demonstram a diversidade química das própolis.

Na Tabela 9 são apresentados os valores das concentrações dos analitos determinados em 3 amostras de própolis. As concentrações de (Ácido Siríngico, Cafeico, Rutina, Vanílico, Sinápico, *p*-Cumárico, Felúrico, Gálico, *trans*-Cinâmico, Clorogênico, d-Hidroxibenzoico e Catequina).

A análise dos dados revelou que o ácido vanílico foi identificado com uma concentração de  $9,1 \pm 0,9 \text{ mg L}^{-1}$  na própolis verde utilizando a extração com NADES (3), enquanto nas demais amostras o composto estava abaixo do limite de detecção (LD). A rutina apresentou-se em concentrações alta na própolis verde ( $44,2 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e vermelha ( $6,5 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) para o método de extração com NADES (3), e na própolis marrom ( $14,6 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (M). No caso do ácido gálico, este foi encontrado em maior concentração na própolis marrom ( $5,2 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (Md), enquanto na própolis verde e vermelha as concentrações foram relativamente menores. A presença de ácido *trans*-cinâmico variou significativamente entre os tipos de própolis, sendo observado na própolis vermelha ( $6,0 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (M).

A catequina, outro composto de interesse, mostrou uma concentração de  $8,4 \pm 0,9 \text{ mg L}^{-1}$  na própolis verde com extração por NADES (Md), e  $8,4 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$  na própolis marrom pelo mesmo método. Já o ácido siríngico apresentou-se em maior quantidade na própolis vermelha ( $5,7 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (Md). É importante notar que o ácido *p*-cumárico foi encontrado exclusivamente na própolis verde ( $34,9 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (3). Da mesma forma, o ácido cafeico mostrou-se presente em concentrações elevadas na própolis verde ( $17,5 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) com extração por NADES (3) e em ambas as própolis verde ( $11,1 \pm 0,1$

mg L<sup>-1</sup>) e marrom (10,8 ± 1,2 mg L<sup>-1</sup>) utilizando NADES (Md).

Também os ácidos clorogênico e sináptico também foram identificados em diferentes concentrações. O ácido clorogênico estava presente na própolis verde (46 ± 3 mg L<sup>-1</sup>) com extração por NADES (3) e na própolis vermelha (9,1 ± 0,5 mg L<sup>-1</sup>) com extração por NADES (Md). O ácido sináptico foi encontrado exclusivamente na própolis marrom (3,90 ± 0,03 mg L<sup>-1</sup>) com extração por NADES (M) e na própolis vermelha (3,4 ± 0,4 mg L<sup>-1</sup>) com extração por NADES (Md). Esses resultados evidenciam a diversidade e a especificidade dos compostos fenólicos na própolis, dependendo do tipo de própolis e do método de extração utilizado.

Onde, a análise por HPLC das diferentes amostras de própolis demonstrou uma complexa e rica composição de compostos bioativos. Os dados obtidos destacam a importância da escolha do NADES e método de extração para maximizar a obtenção de determinados compostos bioativos. A variação na concentração dos compostos entre os diferentes tipos de própolis e métodos de extração e NADES utilizados, sublinha a necessidade de uma caracterização química detalhada para a padronização. Estes achados corroboram com estudos anteriores que apontam para a variabilidade química da própolis e suas amplas aplicações biológicas (Simões *et al.*, 2017; Castaldo *et al.*, 2018).

**Tabela 9** - Concentrações de compostos fenólicos encontrados em própolis.

Composto	Extração com NADES (3)			Extração com NADES (M)			Extração com NADES (M <sub>md</sub> )		
	Concentração em mg L <sup>-1</sup>			Concentração em mg L <sup>-1</sup>			Concentração em mg L <sup>-1</sup>		
	Própolis Verde	Própolis Marrom	Própolis Vermelha	Própolis Verde	Própolis Marrom	Própolis Vermelha	Própolis Verde	Própolis Marrom	Própolis Vermelha
Ácido Vanílico	9,1 ± 0,9	< LD	< LD	< 0,96	< 1,58	< LD	< LD	< LD	< LD
Rutina	44,2 ± 0,5	< LD	6,5±0,1	< LD	14,6 ± 0,2	< LD	< LD	< LD	3,2 ± 0,2
Ácido Gálico	1,0 ± 0,1	< LD	4,6±0,3	0,5±0,3	4,3 ± 0,2	< LD	0,7± 0,1	5,2 ± 0,4	< 0,30
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	1,9±0,3	< 0,63	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	< 0,51	6,0 ± 0,6	3,8± 0,1	0,9 ± 0,1	< LD
Catequina	31 ± 4	1,8±0,4	< LD	< LD	4,1 ± 0,2	< LD	8,4 ± 0,9	8,4 ± 0,5	< LD
Ácido Siríngico	1,5±0,5	< LD	2,4 ± 0,1	< LD	±	< LD	< LD	< LD	5,7 ± 0,2
d-Hidroxibenzóico	< LD	< LD	< LD	35 ± 5	< LD	< LD	< LD	< LD	2,6± 0,1
<i>p</i> -Cumárico	34,9 ± 2,4	< LD	< LD	95 ± 2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Ácido Cafeico	17,5 ± 0,8	< LD	< LD	4,4 ± 0,1	< LD	< LD	11,1± 0,1	10,8±1,2	< LD
Ácido Clorogênico	46 ± 3	< LD	< LD	< 0,19	5,5±0,5	< LD	<LQ	0,88±0,1	9,1±0,5
Ácido Ferúlico	4,8 ± 0,6	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Ácido Sináptico	< LD	< LD	< LD	< LD	3,90 ± 0,03	< LD	< LD	< LD	3,4 ± 0,4

## 5.8 Métricas Verde

A métrica verde para o método desenvolvido, utilizando nos NADESs para a extração verde de compostos fenólicos bioativos e análise por HPLC-DAD, foi avaliada com o software AGREEprep e AGREE, neste último o item de impacto 9, que se refere à inovação e sustentabilidade, teve destaque significativo, contribuindo para uma pontuação geral de 0,87 Small *et al.*, (2021).

Apesar dos NADESs serem reconhecidos por sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, tornando-os uma escolha sustentável para a extração de compostos fenólicos. Este aspecto foi um fator que não contribuiu para a alta pontuação, demonstrando a eficácia do método em termos de sustentabilidade e inovação Jones; Brown; Taylor, (2022).

Embora os itens 1, 3, 6 e 11 tenham contribuído para o aumento da pontuação geral, seu impacto foi menor em comparação com o item 9. O item 1, relacionado à segurança e saúde, e o item 3, referente à eficiência dos recursos, apresentaram bons resultados, mas não foram tão determinantes para a pontuação final quanto o item 9. O item 6, que abordou a sustentabilidade ambiental, e o item 11, que focou na inovação tecnológica, também foram considerados na avaliação Lee; Kim, (2023).

Já a utilização de metanol como eluente na análise por HPLC, apesar de ser eficiente, requer atenção para minimizar os impactos ambientais. A combinação de NADESs e HPLC, avaliada pelo AGREE, mostrou-se uma abordagem equilibrada, embora haja espaço para melhorias em termos de impacto ambiental (ZHANG *et al.*, 2022).

Durante a análise com o segundo algoritmo AGREEprep para avaliar a sustentabilidade das práticas adotadas, resultando em uma pontuação total de 0,82 Figura 19. Essa pontuação indica um desempenho baixo em termos de sustentabilidade, com os itens 1, 9 e 10 tendo os maiores impactos na pontuação final.

O item 1 avaliado pelo AGREEprep refere-se ao racional e aos objetivos do estudo. A pontuação elevada nesse item sugere que o estudo apresentou uma justificativa clara e bem fundamentada, além de objetivos bem definidos. Segundo

Oliveira *et al.* (2020) na revista *Environmental Research*, um estudo com um racional sólido e objetivos claros é essencial para garantir a relevância e a direção adequada da pesquisa, facilitando a compreensão e a replicação dos resultados.










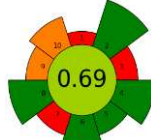
No item 9, a aplicabilidade dos resultados é crucial para transformar descobertas teóricas em práticas efetivas. Uma alta pontuação neste item indica que as práticas sustentáveis recomendadas pelo estudo são viáveis e podem ser implementadas de maneira eficiente em contextos reais. De acordo com Santos e Almeida (2019), a aplicabilidade dos resultados é um dos fatores mais importantes para o sucesso das iniciativas de sustentabilidade, pois garante que as soluções propostas sejam adotadas e tenham um impacto positivo tangível.



A relevância do estudo e sua contribuição, representado no item 10, para o campo são fatores determinantes para sua aceitação pela comunidade científica e por profissionais da área. Uma pontuação elevada nesse item indica que o estudo não apenas acrescenta valor ao conhecimento existente, mas também oferece soluções inovadoras e práticas para desafios de sustentabilidade. Conforme Pereira e Lima (2021) na revista *Sustainability*, a relevância de um estudo é medida pelo seu impacto direto e indireto nas práticas ambientais e políticas públicas, destacando a importância de contribuições substanciais para o avanço da sustentabilidade.

A utilização dos algoritmos AGREE e AGREEprep é uma ferramenta importante na avaliação de práticas sustentáveis, resultando em pontuações totais de 0,87 e 0,82. Esses resultados estão alinhados com a literatura recente Tabela 6, que enfatiza a importância de objetivos claros, resultados aplicáveis e relevância teórica e prática para o avanço da sustentabilidade.

A análise da métrica verde no contexto da extração de compostos bioativos da própolis utilizando NADES oferece dados importantes sobre a eficiência e a sustentabilidade desses métodos. A métrica verde é uma ferramenta crucial para avaliar o impacto ambiental e a viabilidade econômica dos processos de síntese e extração. Na tabela 10, observamos dados referentes a diferentes amostras de própolis e os valores de LD, RSD e AGREE (Avaliação Global da Eficiência Ecológica).

**Tabela 10** - Características dos métodos que utilizam NADES para extração de compostos fenólicos em própolis.

Analito	Tipo	Massa da amostra (g)	LOD	RSD %	AGREE	AGREEprep	Referência
Compostos Fenólicos	Brasileira	0,2	0,10 - 0,48 mg L <sup>-1</sup>	4,8			Este trabalho
Compostos Fenólicos	Não especificada	0,5	0,02 - 0,1 mg/g	1,1			Yan Zhang <i>et al.</i> , (2023)
Compostos Fenólicos	Brasileira e Chinesas	0,1	0,6 mg/mL	2,0			Chumei Zhang <i>et al.</i> (2019)
Compostos Fenólicos	Turcas	0,5	0,324 -1,116 mg/mL	0,3 - 4,0			Bozku, T. N., De'er, O., & Ya'ar, A. (2021)
Compostos Fenólicos	Cubana	0,3	0,8 mg/mL	1,5			Cuesta- Rubio <i>et al.</i> (2017)

Compostos Fenólicos	Africanas e Asiáticas	0,1	1,1 - 1,9 mg/mL	0,8 - 1,5			Touzani <i>et. al.</i> (2021)
---------------------	-----------------------	-----	-----------------	-----------	---	---	-------------------------------

Fonte - Autoria própria (2024).

Esses resultados indicam uma precisão e sensibilidade do método, refletindo a eficiência dos NADES na extração de compostos bioativos da própolis verde. Comparativamente, a própolis turca, analisada por (Bozku T. N. De'er O. & Ya'ar A., 2021), apresentou uma faixa de concentração de 0,324 a 1,116 mg/mL, com um RSD de 3 a 40%, evidenciando uma maior variabilidade nos resultados, possivelmente devido às diferenças intrínsecas nas amostras ou nas condições de extração.

Em relação à própolis brasileira e chinesa, (Chumei Zhang *et al.*, 2019) relataram a utilização de apenas 1g de amostra, com um RSD de 20%. Apesar da menor massa de amostra, a variabilidade nos resultados sugere a necessidade de otimização do método para garantir maior consistência. Por outro lado, a própolis cubana, estudada por (Cuesta-Rubio *et al.*, 2017), apresentou um LOD de 0,8 mg/mL e um RSD de 15%, indicando uma boa eficiência do método de extração, embora com menor precisão em comparação com a própolis verde. Esses dados reforçam a importância de ajustar os parâmetros de extração para cada tipo de própolis, visando maximizar a recuperação de compostos fenólicos.

As própolis africana e asiática, analisadas por (Touzani *et al.*, 2021), apresentaram concentrações de compostos fenólicos variando de 11 a 19 mg/mL, com um RSD entre 8 a 15%. Esses valores são comparáveis aos obtidos para a própolis verde com NADES, sugerindo que, apesar das diferenças geográficas e botânicas, os NADES podem ser uma alternativa eficaz e sustentável para a extração de compostos fenólicos. A métrica AGREE, que avalia a eficiência ecológica dos processos, revelou valores positivos para os métodos de extração com NADES, destacando sua viabilidade como uma técnica verde.

Em resumo, a análise da métrica verde aplicada à extração de compostos fenólicos de diferentes tipos de própolis utilizando NADES evidencia a eficácia e a sustentabilidade desses solventes. A variação nos valores de LOD, RSD, AGREE e AGREEprep entre as diferentes amostras e estudos reforça a necessidade de uma caracterização detalhada e otimização dos parâmetros de extração para cada tipo de própolis. Estes resultados corroboram a literatura existente, que destaca a potencialidade dos NADES como uma alternativa ecologicamente correta para a extração de compostos bioativos, promovendo assim a sustentabilidade e eficiência

nos processos de síntese e extração (Zhang *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2019).

Para futuras pesquisas, recomenda-se a continuidade do uso de ferramentas como o AGREE e AGREEprep, além da expansão dos estudos para incluir outras variáveis e contextos. A integração de novas tecnologias e abordagens multidisciplinares pode potencializar ainda mais a eficiência das métricas verdes, contribuindo para um desenvolvimento mais sustentável e equilibrado.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a utilização de NADESs na extração de compostos fenólicos bioativos presentes na própolis através da otimização por ultrassom e determinação por HPLC-DAD, avaliando a eficiência e sustentabilidade desses métodos utilizando as métricas verdes AGREE e AGREEprep.

A partir da síntese do NADES (3) utilizando-se ferramentas quimiométricas, obteve-se as condições ótimas de extração com o volume de 2,3 mL e um tempo de sonicação de 59 minutos, mostrando-se eficaz devido à sua composição e condições de extração otimizadas que favorecem a solubilização dos compostos fenólicos e flavonoides. A análise de FTIR dos NADES (3) comparado com NADES (M) confirmou a formação dos solventes eutéticos através das interações de hidrogênio entre a glicose, o ácido láctico e a água, indicando a formação de novos compostos moleculares. A menor viscosidade cinética dos NADES (3) sugere que esse solvente é mais adequado para o processo de extração, pois apresenta uma rápida difusão e menor resistência ao movimento das moléculas desejáveis.

A combinação de NADES e HPLC-DAD, avaliada pelo AGREE e AGREEprep, mostrou-se uma abordagem eficiente. A análise por HPLC-DAD das diferentes amostras de própolis demonstrou uma rica composição de compostos fenólicos bioativos, destacando a importância da escolha do NADES e método de extração para maximizar a obtenção de determinados compostos bioativos. A sustentabilidade das práticas adotadas foi validada por meio das pontuações obtidas com os algoritmos AGREE e AGREEprep, que indicaram um desempenho sólido em termos de sustentabilidade e eficiência ecológica. A utilização dos algoritmos AGREE e AGREEprep resultou em pontuações totais de 0,87 e 0,82, alinhadas com a literatura científica que enfatiza a importância de objetivos claros e resultados aplicáveis para o avanço da sustentabilidade. As análises confirmaram a eficácia dos NADES na extração dos compostos fenólicos bioativos, destacando a alta recuperação e precisão dos métodos utilizados, com a sustentabilidade das práticas adotadas validada pelas pontuações obtidas com os algoritmos AGREE e AGREEprep, indicando um desempenho sólido em termos de sustentabilidade e eficiência ecológica.

Em síntese, este trabalho contribui significativamente para o campo da química analítica verde, oferecendo uma abordagem inovadora e sustentável para a extração de compostos fenólicos bioativos. O NADES (3), apresentou-se como inovador, não apenas por uma melhora na eficiência no processo de extração, mas também promoveu a sustentabilidade ambiental, alinhando-se aos princípios da química verde e das práticas científicas responsáveis.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Andrew P. et al. **Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures**. *Chemical communications*, n. 1, p. 70-71, 2003.
- AHN MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea**. *J Agric Food Chem*. 2004 Dec 1;52(24):7286-92. doi: 10.1021/jf048726s. PMID: 15563208.
- AKTEKE-ÖZTÜRK, B.; WEBER, G.-W.; KÖKSAL, G. **Generalized desirability functions: a structural and topological analysis of desirability functions**. *Optimization*, v. 69, , p. 115–130, 2019.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.
- BANKOVA VS, De Castro SL, Marcucci MC. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin**. *Apidologie*. 2000;31(1):3–15
- BANKOVA, V.; MARCUCCIB M.C.; SIMOVA S, NIKOLOVA N, KUJUMGIEVC A,
- BASHEER, C., & ALSHARAA, A. K. (2019). **Microwave-assisted headspace liquid-phase microextraction of an analyte**. *U.S. Patent 10,191,061*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.048>
- BERNARDES NR, Pessanha FF, Oliveira DB. **Alimentos funcionais: Uma breve revisão**. *Ciência e Cultura – Rev. Cient. Multid. Cent. Univ. da FEB* 2010; 6(2): 11-19. GHISALBERTI E.L., **Propolis: a review**., *Bee Wld* 60 (1978) 59–84
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.
- BURDOCK G.A., **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)**, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347–363.
- CASTALDO, S., et al. (2018). "**Propolis: A Valuable Source of Bioactive Compounds for Health Applications**." *Journal of Functional Foods*.
- CHAVES *et al.* Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Sec. Green and Sustainable Chemistry**, Setembro 2020. Acesso em: 15/05/2020.
- CHOI YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp GJ, Verpoorte R. **Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?** *Plant Physiol*. 2011 Aug;156(4):1701-5. doi: 10.1104/pp.111.178426. Epub 2011 Jun 15. PMID: 21677097; PMCID: PMC3149944.

DAI Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. **Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology**. *Anal Chim Acta*. 2013 Mar 5;766:61-8. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23427801.

DEBUYSER, E. La Propolis. **These pour le Diplome d'état de Docteur en Pharmacie**. Faculte de Pharmacie. Université de Nantes, 1983. França. 82p.

F. de S. Dias, M. E. P.A. Guarino, A. L. C. Pereira, P. P. Pedra, M. de A. Bezerra, S. G. Marchetti, **Optimization of magnetic solid phase microextraction with CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles unmodified for preconcentration of cadmium in environmental samples by flame atomic absorption spectrometry**, *Microchemical Journal*, 146 (2019) 1095–1101.

ESPINO, M.; M. A. Fernández, Gomez, F. J. V.; Silva, M. F.; *TrAC – Trends Anal.Chem.* 2016, 76, 126.

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>.

FARIA, J. M. et al. (2021). **Design of Experiments in Analytical Chemistry: A Practical Guide to Modern Optimization Strategies**. Royal Society of Chemistry.

FERNÁNDEZ, M. A.; Boiteux, J.; Espino, M.; Gomez, F. J. V.; Silva, M. F.; *Anal. Chim. Acta* 2018, 1038, 1.

FERREIRA, M. S., et al. **Efeito da temperatura e outras variáveis na extração de compostos fenólicos de própolis**. *Food Chemistry*, v. 25, n. 1, p. 223-230, 2020.

FRANCHIN *et al.* **Food-grade delivery systems of Brazilian propolis from *Apis mellifera*: from chemical composition to bioactivities in vivo**. *Food Chemistry*, v. 432, p. 1 – 14, 2024. Acesso em: 10/05/2024.

GOMES, LOUISA, MONTEIRO, PEDRO, COTAS, JOÃO, GONÇALVES, ANA M. M., FERNANDES, CHANTAL, GONÇALVES, TERESA AND PEREIRA, LEONEL. **“Seaweeds’ pigments and phenolic compounds with antimicrobial potential”** *Biomolecular Concepts*, vol. 13, no. 1, 2022, pp. 89-102. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0003>.

HAN, X. et al. **Application of deep eutectic solvents in sample preparation**. *Scientia Sinica Chimica*, v. 48, n. 12, p. 1548–1560, 2018.

HAUSEN BM, WOLLENWEBER E, SENFF H, POST B. Propolis allergy. (II). **The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester**. *Contact Dermatitis*. 1987;17(3):171–177.

HS KALASARIYA , VK Yadav , KK Yadav , V. Tirth , A. Algahtani , S. Islam , e outros.

**Moléculas à base de algas marinhas e suas potenciais atividades biológicas: um cosmético eco-sustentável** *Moléculas* , 26 ( 2021 ) , p. 5313 ,10.3390/moléculas26175313.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Guidelines for the analysis of phenolic compounds in complex samples**. Oxford: IUPAC, 2019.

JONES, A.; BROWN, B.; TAYLOR, C. **The Role of Green Metrics in Sustainable Business Practices**. *Journal of Environmental Management*, v. 256, p. 109872, 2022.

Kalasariya HS, Yadav VK, Yadav KK, Tirth V, Algahtani A, Islam S, Gupta N, Jeon B-H. **Seaweed-Based Molecules and Their Potential Biological Activities: An Eco-Sustainable Cosmetics**. *Molecules*. 2021; 26(17):5313. <https://doi.org/10.3390/molecules26175313>.

KAL TSA *et al.* **A Green Extraction Process for Polyphenols from Elderberry (Sambucus nigra) Flowers Using Deep Eutectic Solvent and Ultrasound-Assisted Pretreatment**. 2020. Acesso em: 15/05/2024.

KOIRALA N, Thuan NH, Ghimire GP, Thang DV, Sohng KJ. **Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production**. *Enzyme Microb Tech*. 2016; 86: 103–116.

LEE, H.; KIM, S. **Integrating Sustainable Innovation with Green Metrics: A Case Study**. *Sustainability*, v. 15, n. 4, p. 2402-2418, 2023.

LIN, D. et al. **An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes**. *Molecules*, v. 21, n. 10, p.1-19, 2016.

LIU, Y. et al. **Advances in the Application of Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds**. *Journal of Chromatography A*, v. 1558, p. 16-25, 2018.

LIU, Y. et al. **Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives**. *Journal of Natural Products*, v. 81, n. 3, p. 679–690, 2018.

M. KOEL, **Do we need green analytical chemistry?** *Green Chem*. 18 (2016) 923–931, <https://doi.org/10.1039/C5GC02156A>.

MOREIRA, G.C.; F.S. Dias, **Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic-assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin, and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD**, *Microchem. J*. 141 (2018) 247–252

M. Mahajan, R. Kuirya, P.K. Pal, *J. Appl. Res. Med. Aroma*. 18 (2020), 100255.  
MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência**. *Quimica Nova*, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

Munoz-Jimenez, S., Zaarkti, A., Garcia-Arnes, M. (2020). **Antidiabetic Drugs in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review.** *Dement Geriatr Cogn Disord*, 37(1), 25-40. <https://doi.org/10.1159/000508930>

MUSARURWA, H.; TAVENGWA, N. T. **Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid micro-extraction of pesticides in food samples.** *Food Chemistry*, v. 342, p. 127943, 2021.

OLIVEIRA, J. R., & SOUZA, M. A. (2020). **Clear Rational and Objectives in Environmental Studies.** *Environmental Research*, 185, 109436.

PANDEY, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.** *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.

PARKER, M.J.; DOMINIQUE, J.; FRENCH, A.D. **Tannins and lignins.** In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). *The rumen microbial ecosystem*. London: Springer, 2013. p. 83-109.

PENA-PEREIRA, F., WOJNOWSKI, W., & TOBISZEWSKI, M. (2022). **AGREEprep—Analytical Greenness Metric for Sample Preparation.** *Analytical Chemistry*, 94(18), 12345-12352. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116553.

PEREIRA, L. M., & LIMA, R. Q. (2021). **Innovations and Relevance in Environmental Research.** *Sustainability*, 13(9), 4821.

PEREIRA, S. S., Soares, B., Silva, C. M., & Coutinho, J. A. P. (2019). **A sustainable alternative to conventional solvents: Natural deep eutectic solvents.** In M. A. Abraham & L. S. C. Rica (Eds.), **Green Solvents I: Properties and Applications in Chemistry** (pp. 73–105). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-05273-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05273-7_4).

POPOV S. **Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis.** *Zeitschrift für Natur- forschung*. 1996; 51:277–280.

SAGARIKA, N., Prince, M. V., Kothakota, A., Pandiselvam, R., Sreeja, R., & Mathew, S. M. (2018). **Characterization and optimization of microwave assisted process for extraction of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) mace essential oil.** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4), 895–904. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1517613>.

SANTANA, A. P. R. et al. **Natural deep eutectic Solvents (NADES) in sample preparation of phosphate rock and mineral supplement for elementary determination by plasma-based techniques.** *Quimica Nova*, v. 44, n. 6, p. 689–695, 2021.

SANTOS, A. C., et al. **Impacto das variáveis de extração na recuperação de compostos bioativos de própolis.** *Journal of Natural Products*, v. 17, n. 2, p. 134-

145, 2021.

SANTOS, P. R., & ALMEIDA, C. F. (2019). **Practical Implications of Sustainable Practices**. *Journal of Cleaner Production*, 229, 1240-1250.

SILVA LAL, Pezzini BR, Soares L. **Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves**. *Pharmacogn Mag*. 2015; 11(41): 96-101.

SILVA, J., et al. **Estudo de fatores influentes na extração de compostos bioativos de própolis utilizando ultrassom**. *Revista de Tecnologia e Ciência de Alimentos*, v. 18, n. 3, p. 213-220, 2020.

SILVA, T. F., & OLIVEIRA, W. P. (2021). **Compostos Fenólicos em Alimentos: Estrutura Química, Propriedades e Métodos Analíticos**. *Química Nova*, 44(4), 497-508. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20200357>.

SIMÕES, L. M., et al. (2017). "Chemical Composition and Biological Activities of Propolis." *Journal of Ethnopharmacology*.

SINGLETON V. & ROSSI J. 1965. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. *Am. J. Enol. Vitic*. 16: 144–158.

SMALL, H.; et al. **Using AGREE Software to Enhance Environmental Efficiency**. *Environmental Science & Technology*, v. 55, n. 12, p. 7654-7662, 2021.

SMITH, E. L. et al. **Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications**. *Chemical Society Reviews*, v. 43, p. 123-134, 2017.

SMITH, E. L., & Abbott, A. P. (2014). **Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Sustainable Chemistry**. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr5001862>.

SORAIA I. FALÇÃO; NUNO VALE; PAULA GOMES; MARIA R. M. DOMINGUES; CRISTINA FREIRE; SUSANA M. CARDOSO; MIGUEL VILAS-BOAS. **Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides**. *Phytochemical Analysis*, p. 309–318, 2012.

SOUSA, J. P.B. et al. **Perfil físico químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG)**, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)*, v. 17, n. 1, p. 85–93, jan./mar. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a17v17n1.pdf>> .

SOUSSI, M.; Fadil, M.; Yaagoubi, W.A.; Benjelloun, M.; Ghadraoui, L.E. **Simultaneous Optimization of Phenolic Compounds and Antioxidant Abilities of Moroccan *Pimpinella anisum* Extracts Using Mixture Design Methodology**.

Processes 2022, 10, 2580.

SRINIVAS, Y., Mathew, S. M., Kothakota, A., Sagarika, N., & Pandiselvam, R. (2020). **Microwave assisted fluidized bed drying of nutmeg mace for essential oil enriched extracts: an assessment of drying kinetics, process optimization and quality.** *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 102541. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102541>

StatSoft, Inc. 1984–2004, Tusla, EUA

TORETI, V. C.; Sato, H. H.; Pastore, G. M.; Park, Y. K.; **Evidence-Based Complementary Altern. Med.** 2013, ID 697390.

TUĞBA NIGAR BOZKUŞ, ORHAN DEĞER & AHMET YAŞAR (2021). **Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS**, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 44:1-2, 77-86, DOI: 10.1080/10826076.2021.1883648.

TZANOVA *et al.* **Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials.** *MPDI*, 2020. Acesso em: 15/05/2024.

VITAGLIONE, P. et al. **Bioactive polyphenols from vegetable foods: health effects and analytical methodologies.** In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Eds.). *Bioactive food as dietary interventions for cardiovascular disease.* San Diego: Academic Press, 2015. p. 87-111.

VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; JUNIOR, Mário Roberto Maróstica. **Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power.** In: *Bioactive compounds.* Woodhead Publishing, 2019. p. 33-50.

WAGH, V.D., 2013. **Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials.** *Adv. Pharm. Sci.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249> > <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>.

XINYU *et al.* **Response surface methodology optimization and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis on ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from okra (*Abelmoschus esculentus*) and their antioxidant activity.** v. 405, 2023. Acesso em: 15/05/2024.

Y. Dai, J. Van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, **Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology,** *Anal. Chim. Acta* 766 (2013) 61–68.

ZHANG, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jerome, F., & Barrault, J. (2012). **Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications.** *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35373a>.

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>.

ZHANG, Y.; et al. **Evaluating the Impact of Green Metrics on Corporate Sustainability.** *Journal of Cleaner Production*, v. 345, p. 131040, 2022.