



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS- DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Letícia Mendes Borges dos Santos

**Alternativa verde para extração de princípios ativos das folhas de *Psidium guajava* L.
utilizando Solventes Eutéticos Naturais (NADES)**

BAURU

2023



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS- DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Letícia Mendes Borges dos Santos

**Alternativa verde para extração de princípios ativos das folhas de *Psidium guajava* L.,
utilizando solventes eutéticos naturais (NADES)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP), como
parte das exigências para a obtenção
do título de bacharel em Ciências
Biológicas

BAURU

2023

S237a

Santos, Leticia Mendes Borges dos

Alternativa verde para a extração de princípios ativos das folhas de *Psidium guajava* L. utilizando Solventes Eutéticos Naturais (NADES) / Leticia Mendes Borges dos Santos. -- Bauru, 2023

34 p. : il., tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Daniel Rinaldo

1. *Psidium guajava* L.. 2. Metabólitos secundários. 3. NADES. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Letícia Mendes Borges dos Santos

**Alternativa verde para extração de princípios ativos das folhas de *Psidium guajava* L.,
utilizando solventes eutéticos naturais (NADES)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP), como
parte das exigências para a obtenção
do título de bacharel em Ciências
Biológicas

Aprovado em: 10 de Fevereiro de 2023.

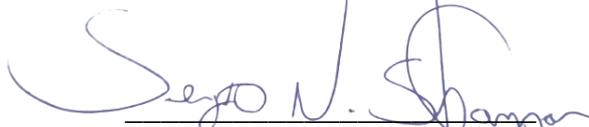
Banca Examinadora



Prof. Dr. Daniel Rinaldo – UNESP Bauru



Profa. Inês Cechin-UNESP Bauru



Prof. Sérgio Nascimento Stampar-UNESP Bauru

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à todos e à UNESP que contribuíram durante toda essa jornada a concretizar minha formação acadêmica, este processo não foi realizado sozinho mas fui apoiada financeiramente e emocionalmente por familiares, amigos, professores e orientador que acreditaram em mim e fizeram o possível para que eu alcançasse meu sonho de ser bióloga.

Agradeço muito ao meu orientador Dr. Daniel Rinaldo pela oportunidade de realizar minha pesquisa no laboratório de Síntese Orgânica e Processos, e agradeço a Vitória, Pietro e Rhayssa que me ajudaram com o desenvolvimento do projeto, muito obrigada pela compreensão, paciência, apoio e dedicação de seus tempos para me ensinar e me ajudar em tudo o que precisei, vocês são incríveis.

Agradeço principalmente à minha família, em especial aos meus pais Simone e Nildo, minha irmã Giovanna, ao Frodo e aos meus tios Maria Luana e Aleixo e a minha prima Beatriz que foram minha base, minha essência de perseverança, que incansavelmente estiveram ao meu lado, sempre me amparando quando mais precisei, me apoiando na decisão de estudar e morar longe tanto financeiramente como emocionalmente, nunca esquecerei o quanto vocês batalharam para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, amo vocês e muito obrigada por estarem sempre comigo.

Novamente agradeço aos meus pais Simone e Nildo por tudo o que vocês proporcionaram para mim, sem vocês ao meu lado não teria como alcançar minhas metas, obrigada por me amarem imensamente, farei o possível para retribuir todo o esforço e compromisso que tiveram comigo. E obrigada Giovanna por estar sempre comigo ao longo desta graduação, nos piores e melhores momentos, amo você.

Um agradecimento especial às matriarcas da família, avó Adelair e especialmente a minha avó Julieta que durante a graduação infelizmente faleceu, gostaria que a senhora ainda estivesse aqui para compartilhar este momento de felicidade e êxito, devo muito a ambas que trilharam e construíram este caminho com muita sabedoria, amor, paciência e dedicação e, que sem vocês não teria obstinação para persistir nos meus sonhos. Vocês são meus exemplos de vida, e sou muito grata por terem as senhoras na minha vida. Amo vocês infinitamente.

“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite e você é imbatível.”

(Racionais MC's)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar uma alternativa segura e sustentável para extrair marcadores (ácido gálico, catequina e rutina) das folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), utilizando uma promissora classe de solventes verdes, denominada Solventes Eutéticos Naturais (*Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). As extrações com NADES foram comparadas com extrações convencionais relatadas na literatura científica e farmacopéias. Foram comparadas as eficiências de 4 extrações convencionais com as de 4 combinações de NADES. Em todas as extrações foi utilizado 1 grama de material vegetal para 20 mL de solvente. Dentre os métodos avaliados, a extração utilizando NADES baseado em cloreto de colina : ácido láctico (1:3, mol/mol) e ultrassom foi a que apresentou a maior eficiência de extração dos marcadores (1) ácido gálico, (2) catequina e (3) rutina das folhas de *P.guajava*. Os NADES são formados por substâncias naturais obtidas de fontes renováveis (metabólitos primários das plantas), sendo essas biodegradáveis e de baixa toxicidade e, portanto, são solventes com grande potencial para substituir os solventes convencionais .

Palavras-chave: *Psidium guajava* L., Metabólitos secundários, NADES.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate a safe and sustainable alternative for extracting markers (gallic acid, catechin and rutin) from guava (*Psidium guajava* L.) leaves, using a promising class of green solvents, called Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). The extractions with NADES were compared with conventional extractions reported in the scientific literature and pharmacopoeias. The efficiencies of 4 conventional extractions were compared with those of 4 combinations of NADES. In all extractions, 1 g of plant material was used for 20 mL of solvent. Among the methods evaluated, extraction using NADES choline chloride : lactic acid (1:3, mol/mol) based and ultrasound showed the highest extraction efficiency for the markers (1) gallic acid, (2) catechin, and (3) rutin from *P.guajava* L. leaves. NADES are formed by natural substances obtained from renewable sources (primary plant metabolites), which are biodegradable and of low toxicity and, therefore, are solvents with great potential to replace conventional solvents.

Key-words: *Psidium guajava* L., Secondary Metabolites , NADES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Psidium guajava</i>	14
Figura 2- Goiabeira (<i>Psidium guajava</i>)	14
Figura 3- Domínios fitogeográficos da goiabeira	15
Figura 4- Método de extração por decocção	20
Figura 5- Extração Assistida por Ultrassom (UAE)	20
Figura 6- Amostras em <i>vials</i> dos métodos: decocção, ultrassom, maceração dinâmica e percolação	21
Figura 7- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos compostos fenólicos pelo método de decocção dos extratos das folhas de goiabeira	23
Figura 8- Estrutura química dos compostos fenólicos do extrato da folha de goiabeira	23
Figura 9- Comparação de rendimento entre os métodos de extração	24
Figura 10- Comparação dos compostos com maior rendimento entre os métodos de decocção e ultrassom (d/u)	24
Figura 11- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos compostos fenólicos do NADES ácido láctico: cloreto de colina (1:1) dos extratos das folhas de goiabeira	26
Figura 12- Extração dos compostos fenólicos nas combinações de NADES	27
Figura 13- Comparação entre os métodos eficientes de extração (NADES 2 e decocção) dos compostos fenólicos	27
Figura 14- Composto fenólico com maior área/rendimento nas extrações por NADES 2 e decocção	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Preparação das diferentes combinações de NADES.....	19
Tabela 2- NADES solubilizados em 20% de H ₂ O e os aspectos das misturas eutéticas	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Psidium guajava</i> L.	13
1.2 Química Verde	16
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Material botânico	18
3.2 Preparo dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)	19
3.3 Extração dos princípios ativos da <i>Psidium guajava</i>	19
3.3.1 Reprodução de extrações para referência	19
3.3.2 Extração utilizando NADES	21
3.4 Análises por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Avaliação dos extratos por métodos convencionais	22
4.2 Preparo dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)	25
4.3 Avaliação dos solventes eutéticos naturais (NADES)	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	30

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade das plantas medicinais e o conhecimento de suas propriedades químicas e fitoterápicas passaram de geração para geração, bem como seu uso na medicina tradicional proporcionou práticas de cura, prevenção e tratamento de doenças pela humanidade (FIRMO *et al*, 2011; ROSSI *et al.*, 2021). Os conhecimentos medicinais sobre as plantas são datados de longos séculos em que diferentes culturas e povos usufruíam de seus componentes e as utilizavam de diversas formas, cada qual com modo de preparo e finalidade (EMBRAPA, 2010).

No século XX o desenvolvimento de pesquisas voltadas aos extratos vegetais medicinais proporcionou a descoberta e isolamento de princípios ativos e substâncias de interesse terapêutico como taninos, alcalóides, compostos fenólicos, óleos essenciais e vitaminas (EMBRAPA, 2010; FIRMO *et al*, 2011; ZAGO, 2018). Dessa maneira, a síntese de novos medicamentos a base de plantas foi intensificada e, por vezes, os remédios sintéticos foram substituídos por esses devido a grande diversidade vegetal disponível, baixo custo de produção e efeito colateral menos nocivo ao organismo (GADELHA *et al*, 2013).

Esta preferência foi confirmada por dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em que 80% da população mundial fazia uso das plantas medicinais ou medicamentos produzidos por meio de substâncias vegetais (ZARDETO-SABEC *et al*, 2019). Isto impactou também no interesse econômico sobre essas, movimentando mundialmente cerca de US\$18 bilhões de dólares em 2005 (KHAN & RAUF, 2014), já no Brasil, a venda dos medicamentos derivados de plantas cresce cerca de 10% ao ano, alcançando em 2001 US\$ 550 milhões (BRASIL, 2006) e, atualmente o mercado farmacêutico brasileiro atingiu o faturamento de R\$ 53,9 bilhões (BRASIL, 2017).

Enfatiza-se também que a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) em 2006 facilitou o acesso pela população brasileira aos extratos vegetais e fitoterápicos de modo seguro, assegurando a qualidade dos produtos, valorizando o avanço industrial e fornecendo soluções tecnológicas e terapêuticas (BRASIL, 2006; GADELHA *et al*, 2013). Outro fator notável dos compostos vegetais fazerem parte da medicina brasileira foi a inserção desses pelo Sistema Público de Saúde (SUS), permitindo que tanto os pacientes como os profissionais de saúde tivessem outras opções de tratamento além daquelas

convencionais, garantindo acesso aos serviços relacionados a fitoterapia e à inclusão social (BRASIL, 2006).

Ainda, as diretrizes da PNPMF proporcionaram que a biodiversidade brasileira fosse priorizada por meio de incentivos às pesquisas e ao desenvolvimento de plantas medicinais, sendo que essa representa de 15 a 20% da biodiversidade mundial, em que 24% são espécies vegetais. Dentre essas, a *Psidium guajava* L. (goiabeira) é uma das espécies de grande interesse econômico e medicinal, com variadas propriedades fitoterápicas, sendo presente por toda a América do Sul e bem distribuída em diversas regiões do Brasil (ROCHA *et al.*, 2020).

1.1 *Psidium guajava* L.

A *Psidium guajava* L., popularmente conhecida como goiabeira é uma espécie pertencente ao gênero *Psidium* da família Myrtaceae, originária da América Central e norte da América do Sul, sendo plantada principalmente nas regiões subtropicais e tropicais, com disseminação pelos colonizadores europeus para colônias asiáticas e africanas (LANDAU *et al.*, 2020).

Como notável representante do grupo das Angiospermas, a família Myrtaceae possui uma biodiversidade vegetal de ampla distribuição, sendo abundante e rica nos diferentes biomas brasileiros (RIBEIRO *et al.*, 2022) e, concentradas nas regiões tropicais da América, Ásia e Austrália.

Mundialmente, essa família é representada por cerca de 4000 espécies, distribuídas em 140 gêneros, já na flora brasileira há 1030 espécies de arbustos e árvores, dispostas em 23 gêneros (TRINDADE, 2019). Dentre os gêneros presentes na família Myrtaceae, destaca-se o gênero *Psidium* L., que possui importância econômica no Brasil, e cuja espécies presentes apresentam frutos de sabor exótico e são ricas em compostos fenólicos, óleo essencial e caroteno (DURÃES *et al.*, 2015).

O gênero possui uma variedade de espécies, cerca de 110 a 130 espécies de árvores e arbustos, com folhas simples e opostas com venação broquidódroma, e flores pentâmeras, solitárias, axilares ou pequenos cachos (Figura 1a). Além disso, os frutos se desenvolvem apresentando muitas sementes, que são caracterizadas por um tegumento externo e embrião coclear com cotilédones apicais (DURÃES *et al.*, 2015) (Figura 1b).

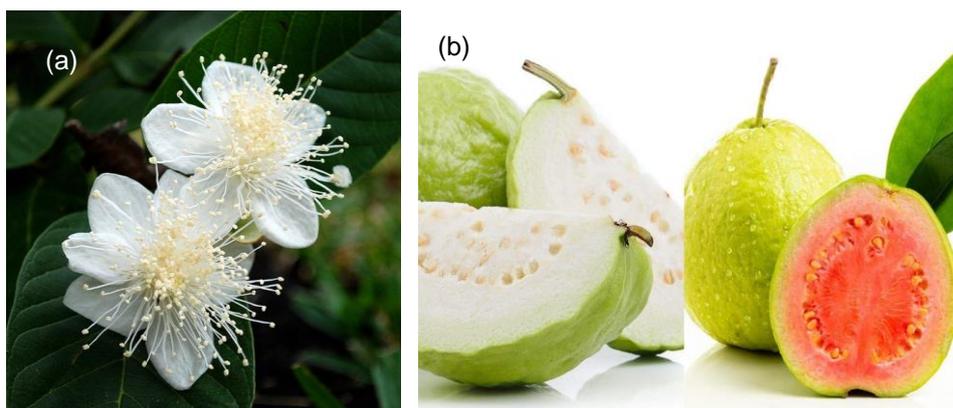


Figura 1: *Psidium guajava*. (a): flor da goiabeira; (b): frutos goiaba branca e vermelha

Fontes: Abrafrutas, Meu Pomar

Dentre as espécies presentes no gênero *Psidium*, enfatiza-se a *Psidium guajava* L. ou goiabeira, uma espécie pioneira e considerada como a mais importante do gênero. A goiabeira é um arbusto ou árvore frutífera, podendo atingir até 8 metros de altura e, apresenta uma copa aberta, com numerosos e grandes ramos (Figura 2a), suas folhas possuem de 7 a 15 cm de comprimento, 3 a 6 cm de largura e são opostas e simples do tipo oblongas ou ovaladas, margem inteira, ápice obtuso ou acuminado e base obtusa (Figura 2b) tronco da goiabeira pode medir de 20 a 30 cm de diâmetro, descamante, liso e tortuoso (Figura 2c). Suas flores são brancas, ocorrendo entre os meses de Setembro a Novembro, podendo surgir isoladas ou em inflorescência de duas a três flores monoclinas, com possibilidade de autofecundação. Já os frutos são em forma de baga, com 10 cm de diâmetro com a polpa apresentando coloração avermelhada ou branca (DURÃES *et al.*, 2015; MELO, *et al.*, 2020; SILVA, 2020; TRINDADE, 2019).

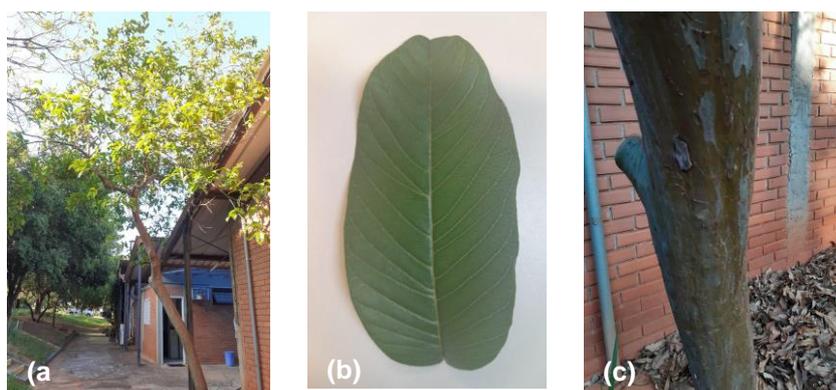


Figura 2- Goiabeira (*Psidium guajava*). (a): árvore da goiabeira; (b): folha de *P. guajava*; (c): tronco

Fonte: Autoria própria

A *Psidium guajava* está presente em toda a América do Sul, Europa, África e Ásia devido a sua fácil adaptação a diversas condições climáticas, no Brasil há também sua ampla distribuição em diferentes regiões e domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SILVA, 2020). A planta de goiabeira e suas partes possuem consideráveis utilidades ambientais e econômicas, como aplicação na restauração de áreas degradadas de preservação permanente e valor de produção R\$ 973.137,00 no Brasil, sendo os Estados de Pernambuco, Bahia, São Paulo e Paraná dentre os principais maiores produtores do fruto (Figura 3) (IBGE, 2021; MELO *et al.*, 2020).



Figura 3: Mapa dos estados brasileiros do valor da produção de goiaba (em mil reais).

Fonte: IBGE (adaptado)

Em diferentes culturas e países, principalmente as folhas da goiabeira são usadas de maneiras distintas, nos países asiáticos usam seus extratos contra diarreia, diabetes *mellitus*, úlceras, febres, espasmos, entre outros. Nos países africanos, as partes da goiabeira são aplicadas contra cólicas estomacais, hipertensão, reumatismo, amebíase, escabiose e faringite. Já na América do Norte, seu uso se faz contra gastroenterite, febre, hipoglicemia, dermatite e infecções. E nos países da América do Sul são aplicados para combater dor reumática, tosse, conjuntivite, pneumonias, parasitoses, laringite, dentre outros. No Brasil, sua utilização fitoterápica principalmente advinda da extração das folhas, é aplicada contra problemas digestivos, inflamações em mucosas, insuficiência gástrica, diarreia, etc. (FERREIRA, 2009).

As propriedades medicinais citadas anteriormente da *P. guajava* estão relacionadas com a presença dos princípios ativos: alcalóides, taninos, flavonóides, terpenóides, carotenóides,

saponinas e óleos essenciais (ROCHA *et al.*, 2020). Suas folhas por apresentarem composição química como os taninos, flavonóides e óleo essencial são relevantes na medicina, principalmente para variados usos fitoterápicos, contra atividades antimicrobianas, antifúngica, antioxidante, anti-hipertensivo e antiproliferativa de células cancerígenas (MELO *et al.*, 2020).

Assim, para extrair esses compostos tanto da *Psidium guajava* como de outras plantas medicinais que são relevantes para a fitoterapia, a indústria farmacêutica e pesquisas científicas buscam alternativas para o desenvolvimento de metodologias químicas que retirem os compostos secundários sendo uma prática sustentável, como a Química Verde.

1.2 Química Verde

O avanço de práticas sustentáveis abrange a transformação de processos químicos prejudiciais ao meio ambiente, aprimorando-os com métodos que apresentem menor nocividade ou utilizando reagentes e solventes alternativos de baixa toxicidade e biodegradáveis (PRADO, 2003). A aplicação de novas metodologias sustentáveis foi elaborada pela Química Verde que, segundo Anastas e Warner (1998) a definiu como o “desenvolvimento de produtos e processos químicos que visam reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas”.

Devido a esta preocupação da Química Verde de evitar e eliminar toda e qualquer substância ou processo químico que fosse agressivo ao meio ambiente e aos seres vivos, 12 princípios foram instituídos e postulados pelos químicos Paul Anastas e John C. Warner no intuito de uma química auto-sustentável, que são (FERREIRA *et al.*, 2014):

1. Prevenção: a prevenção é a melhor opção do que tratar ou limpar os resíduos das reações químicas após formá-los;
2. Economia Atômica: escolha projetar os métodos sintéticos a fim incorporar desde o início, toda a massa dos reagentes do produto;
3. Síntese de Produtos Menos Perigosos: a síntese de produtos químicos devem gerar sempre compostos com toxicidade mínima ao ser humano e ao meio ambiente;
4. Modelo de Produtos Seguros: o desenvolvimento de produtos químicos devem visar que esse exerça sua atividade de forma efetiva sendo o menos tóxico possível;
5. Solventes e Auxiliares mais Seguros: a utilização de constituintes como solventes, agentes de separação, secantes, entre outros, durante os processos químicos devem, se possível, serem ausentes ou quando usados inofensivos;
6. Busca pela Eficiência de Energia: ao realizar procedimentos químicos, é preciso reconhecer seus impactos ambientais e econômicos, sempre conduzindo-os para

minimizar o uso energético, como métodos produzidos a pressão e temperatura ambiente;

7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima: preferência do uso de matérias-primas renováveis aquelas não-renováveis;
8. Minimização da Formação de Subprodutos: deve-se evitar o uso desnecessário de bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos em razão da geração de resíduos ao final desses processos;
9. Catálise: a aplicação de reagentes catalíticos nos procedimentos é melhor do que os reagentes estequiométricos;
10. Desenho para a Degradação: os produtos químicos precisam ser elaborados/desenhados para que, ao final de seus usos, não sejam inofensivos e permaneçam no ambiente;
11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição: será necessário que as metodologias analíticas criadas monitorem, em tempo real, a formação de substâncias prejudiciais;
12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes: durante os procedimentos químicos, deve-se atentar a escolha e ao modo de uso das substâncias para que essas não causem acidentes como vazamentos, explosões e incêndios (FERREIRA *et al.*, 2014; LENARDÃO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

Uma das questões que os 12 princípios da Química Verde enfatiza é a busca por substâncias mais sustentáveis, que diminuam ou eliminem o impacto prejudicial que esses compostos fazem ao ambiente e à saúde humana (BRITO, 2022). Os solventes comumente utilizados no processos produtivos são tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos, voláteis, inflamáveis e explosivos, além de causarem impactos na camada de ozônio, bioacumulativos e são obtidos de fontes não-renováveis (UNGER 2022). Dessa forma, foram desenvolvidos os solventes sustentáveis a fim de substituir esses nocivos, chamados de *Natural Deep Eutectic Solvent* (Solvente Eutético Natural “Profundo”), mais conhecidos pela sigla NADES (CHOI, 2011).

Os NADES fazem parte do grupo de solventes eutéticos (DES) e são formados por dois ou mais elementos, em que um atua como doador de ligações de hidrogênio e outro o receptor do hidrogênio, formando fortes interações intermoleculares. Os componentes que formam o solvente orgânico são de procedências naturais provenientes usualmente de metabólitos primários das plantas, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos (CHOI, 20011; SAVI, 2019). Dentre os componentes mais utilizados para a síntese de NADES estão: cloreto de colina, glucose, ácido cítrico, ácido málico, frutose, sacarose, xilitol, etc (SANTANA *et al.*, 2021).

Além disso, suas características como baixa toxicidade, biodegradabilidade, alta capacidade de solubilização de substâncias diversas, viscosidade ajustável, baixo ponto de fusão, menor gasto energético (UNGER, 2022), elevada capacidade de solubilização tanto de compostos polares como apolares, dentre outros, possibilitaram a aplicação do NADES na extração de compostos secundários de espécies vegetais, sobretudo das plantas medicinais que possuem grande impacto na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentos (CRUZ, 2018; SAVI, 2019). Dessa forma, os NADES atendem 4 dos 12 princípios essenciais à Química Verde ao extrair princípios ativos, que são: solventes e auxiliares mais seguros, busca pela eficiência de energia, uso de fontes renováveis de matéria-prima e química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes (UNGER, 2022).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar alternativas mais seguras e sustentáveis para a extração dos marcadores das folhas de goiabeira (*P. guajava*). Especificamente, foram realizadas extrações utilizando diferentes NADES como solventes extratores e a eficiência foi comparada com a de extrações convencionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no grupo *Green Biotech Network* do Laboratório de Síntese Orgânica e Processos (LSOP), da Faculdade de Ciências, UNESP, campus de Bauru.

3.1 Material botânico

As folhas de *P. guajava* foram coletadas no dia 10 de novembro de 2022 no período da tarde na época de primavera, próximas ao Biotério e ao Laboratório de Química Analítica e Cromatografia, localizados no Campus da UNESP de Bauru (22°20'57.1"S 49°01'50.7"W).

Posteriormente a coleta, as folhas de goiabeira foram lavadas e congeladas por sublimação a -20 °C no intuito de preservar as propriedades do material. Estas permaneceram no congelador por um período de 24 horas. Após este período, as folhas foram liofilizadas durante 4 dias, pulverizadas em um liquidificador industrial (LB Balanças, Brazil). O material pulverizado foi peneirado para padronização das partículas e armazenado em frascos hermeticamente fechados sob proteção da luz.

3.2 Preparo dos Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES)

Foram preparadas 4 combinações distintas de diferentes compostos em diferentes proporções de razões molares para serem avaliados quanto a formação de misturas eutéticas. Todos os NADES preparados foram diluídos com 20% de água m/m (Tabela 1). As combinações foram pesadas e colocadas em *vials*, posteriormente, as combinações foram aquecidas em banho-maria, utilizando chapas de aquecimento, durante 1 hora a, aproximadamente, 60 °C. Após as misturas ficarem líquidas, homogêneas e transparentes, aguardou-se 4 dias para confirmar que as combinações formaram misturas eutéticas. Caso as misturas voltassem para o estado sólido, as mesmas não seriam consideradas misturas eutéticas e seriam desconsideradas nos estudos posteriores.

Tabela 1- Preparação das diferentes combinações de NADES

	Componente 1	Componente 2	Razão Molar
Combinação 1	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:1
Combinação 2	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:3
Combinação 3	Cloreto de colina	Glicose	1:1
Combinação 4	Ácido málico	Sorbitol	1:1

3.3 Extração dos princípios ativos da *Psidium guajava*

3.3.1 Reprodução de extrações para referência

Com base em pesquisas bibliográficas realizadas, foram selecionados 4 métodos convencionais para reprodução e comparação com os métodos que utilizaram NADES para extração dos marcadores das folhas de goiabeira.

O primeiro artigo de referência reproduzido foi do Birdi e colaboradores (2010), que utilizaram o método de extração por decocção, utilizando 1 g de material vegetal pulverizado em uma solução de 20 mL de água ultrapura do tipo I (MilliQ®). Esta mistura foi aquecida a 80°C até atingir a ebulição, sendo em seguida, retirada do aquecimento(Figura 4).



Figura 4- Método de extração por decocção
Fonte: Autoria própria

O segundo método reproduzido, conforme o artigo de Metwally *et al.* (2010), foi uma extração hidroetanólica por meio de percolação, utilizando 1 g de matéria prima seca e pulverizada, misturando-a em 20 mL do solvente ETOH:H₂O (1:1) (v/v). A solução resultante foi filtrada por meio de uma seringa preenchida ao fundo com algodão, durante 15 minutos.

Outra extração hidroetanólica realizada foi a maceração dinâmica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), utilizando 20 mL de ETOH:H₂O (7:3) (v/v) em 1 g de material vegetal pulverizado, e essa solução foi aquecida a 40°C com rotação de 320 rpm durante 30 minutos.

Por fim, foi preparado o método por extração hidrometanólica, com uma quantidade de 1g de matéria prima seca e adicionando solvente MEOH:H₂O (1:1) (m/m). A solução foi feita por meio da extração assistida por ultrassom (UAE) durante 1 hora à temperatura ambiente (Figura 5).



Figura 5- Extração Assistida por Ultrassom (UAE)
Fonte: Autoria própria

Por conseguinte aos métodos de extração citados anteriormente, as amostras foram centrifugadas duas vezes por um período de cinco minutos cada. O sobrenadante resultante desse ciclo de centrifugação foi retirado, filtrado em um microfiltro PTFE (0,45 μm) e armazenado em *vials* (Figura 6), logo após, foi injetado e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD).



Figura 6- Amostra em *vials*; d:decocção, u:ultrassom, md: maceração dinâmica e p: percolação
Fonte: Autoria própria

As áreas referentes aos picos dos marcadores foram determinadas por integração, num comprimento de onda de 280 nm, utilizando o sistema CLAE-DAD e os dados obtidos foram analisados e colocados no software Microsoft® Excel 2016.

3.3.2 Extração utilizando NADES

No método de extração utilizando os NADES como solventes extratores, foi utilizada uma razão de 1:1 de material vegetal por solvente (m/m) e conduzidos a extração assistida por Ultrassom (UAE) a 50 °C e 60 min. Após serem submetidos ao ultrassom, os extratos foram diluídos em 2 mL de ETOH (1:1, v/v) e centrifugados duas vezes por um tempo de cinco minutos. Os sobrenadantes foram retirados, filtrados em microfiltro PTFE (0,45 μm) e armazenados em *vials* para posteriormente serem analisados por CLAE-DAD.

3.4 Análises por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

As análises das extrações de referência e das extrações com NADES foram realizadas em um equipamento CLAE-DAD (Shimadzu®, bomba LC-20AT, de gaseificador DGU-20A5R, amostrador SIL-20HT, forno de coluna CTA-10AS VP e interface CBM-20A, DAD SPD-M20A), usando como fase móvel aquosa H₂O com 0,1 % de TFA (FASE A) e como fase

orgânica MeOH (FASE B). Para a separação, foi utilizado como fase estacionária uma coluna Luna C18 (Phenomenex ®, 250 x 4,6 mm, 5 μm) e a aquisição do cromatograma foi feita pelo *software* LabSolutions (Shimadzu ®). O monitoramento dos experimentos foram feitos em $\lambda=280$ nm com injeção de 2 μL .

Para a identificação dos compostos alvo, foram analisados os espectros UV obtidos com os dados presentes na literatura (Birdi *et al.*,2010; Farmacopeia Brasileira, 2019; Metwally *et al.*,2010). As amostras foram injetadas em um sistema de gradiente exploratório com variação de B de 5% a 100% em 60 min, com vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 30°C, método adaptado de Snyder, Kirkland e Glajch (1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos extratos por métodos convencionais

Após as análises das amostras por CLAE-DAD, descritas em 3.3.1, foram analisados os espectros UV dos compostos presentes nos extratos das folhas de goiabeira e constatou-se que os compostos predominante foram compostos fenólicos, cujas classes de metabólitos secundários são: ácidos fenólicos, flavononas, flavonas, flavonoides e antocianinas (SANTOS *et al.*, 2017).

Os dados cromatográficos e espectrofotométricos, como tempo de retenção no cromatograma e espectros UV, possibilitaram a identificação dos marcadores das folhas de *P. guajava* como (1) ácido gálico, (2) catequina e (3) rutina (Figura 7 e 8) .

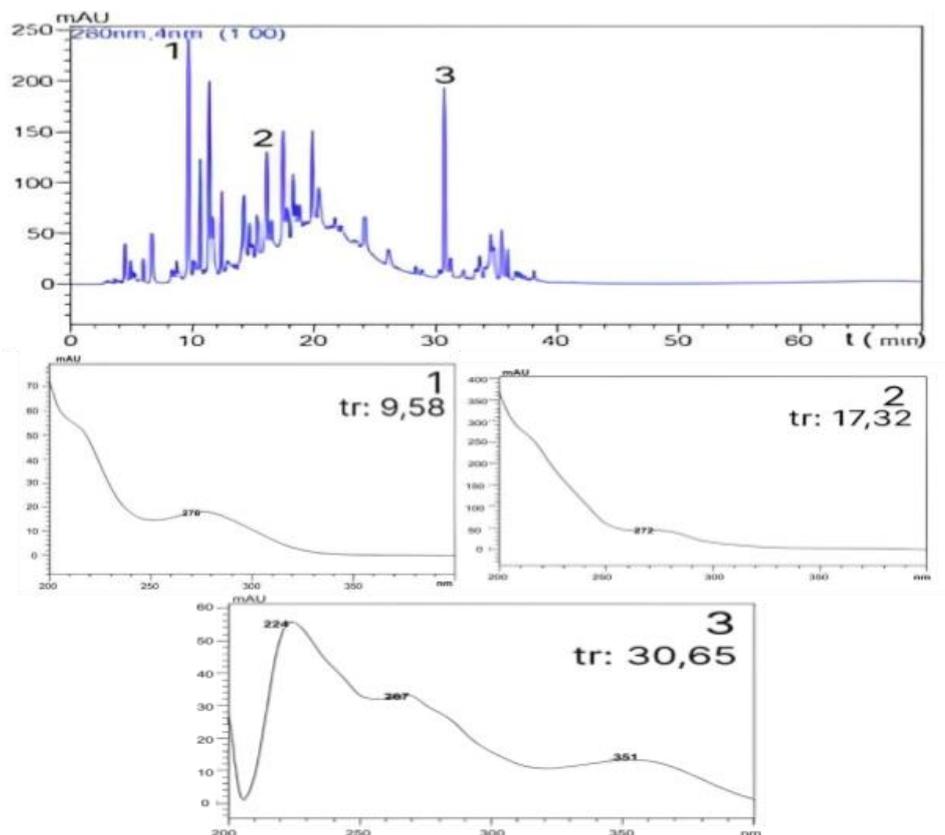


Figura 7- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos compostos fenólicos pelo método de decocção dos extratos das folhas de goiabeira. 1-ácido gálico (tempo de retenção 9,58, detecção a 276 nm); 2-catequina (tempo de retenção 17,32, detecção a 272 nm) 3-rutina (tempo de retenção 30,65, detecção a 224, 267 e 351 nm)

Fonte: Autoria própria

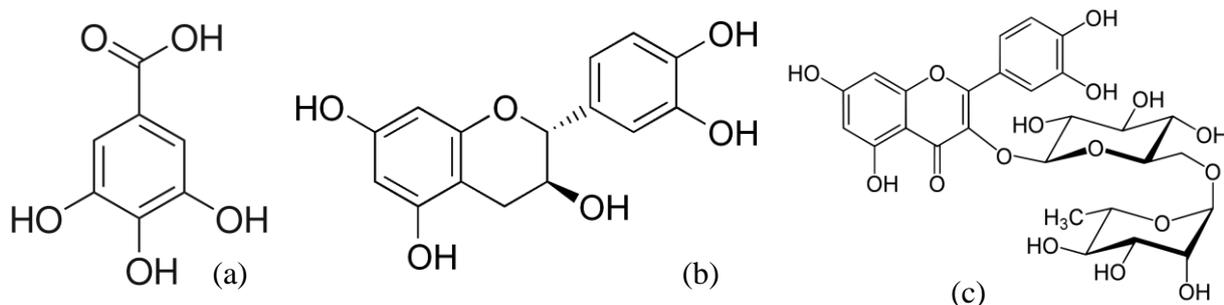


Figura 8- Estrutura química dos compostos fenólicos de extrato das folhas de goiabeira . (a): ácido gálico, (b): catequina, (c):rutina

Fonte: Autoria própria

Os marcadores foram selecionados como compostos-alvo e a área das bandas cromatográficas foram utilizadas como resposta para comparação entre a eficiência de extração dos diferentes métodos avaliados (Figura 9).

Os métodos que mostraram um maior rendimento foram o de ultrassom e decocção, decocção é o método mais eficiente na extração dos compostos fenólicos, principalmente do ácido gálico, (Figura 10).

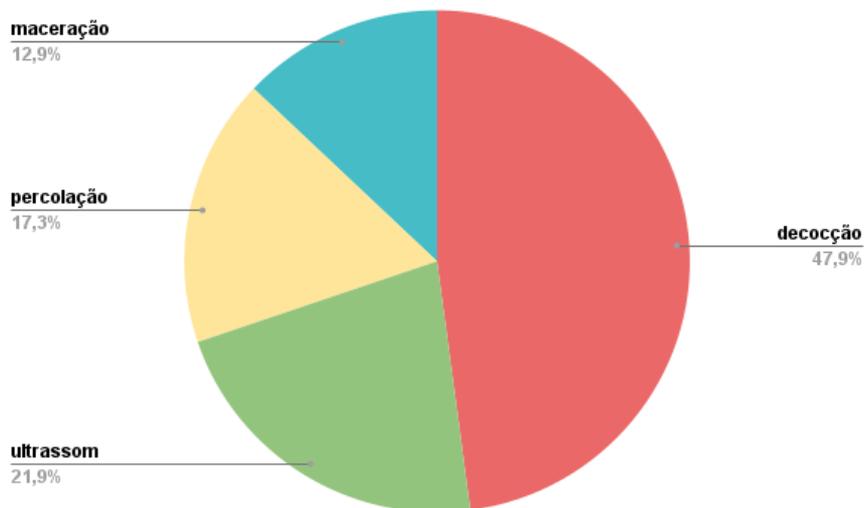


Figura 9- Comparação de rendimento entre os métodos de extração
Fonte: Autoria própria

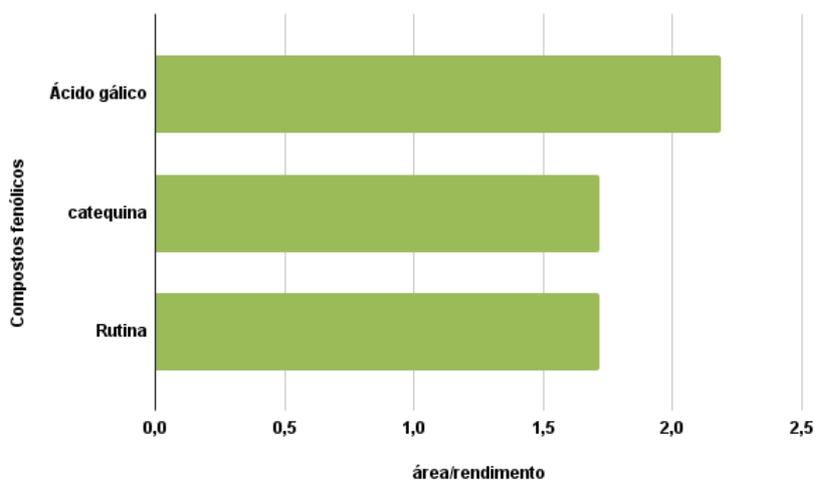


Figura 10- Comparação dos compostos fenólicos com maior rendimento entre os métodos de decocção e ultrassom
Fonte: Autoria própria

Uma possível justificativa para a maior eficiência de extração por decocção pode estar relacionada com o aquecimento e a utilização da água como solvente, segundo Santos e Magalhães (2021). À medida que a temperatura da água aumenta, sua polaridade e constante elétrica diminui, aumentando a solubilidade dos compostos de média polaridade. Além disso, a água a temperatura ambiente, ou seja, quando entra em contato com o material vegetal antes do aquecimento, apresenta maior polaridade do que os solventes orgânicos e, com isso, se

torna mais eficaz na extração de substâncias de maior polaridade (SANTOS, MAGALHÃES, 2021).

Apesar da decocção mostrar eficiência na extração e não utilizar solventes orgânicos considerados tóxicos e prejudiciais, esse é um processo demorado e com maior gasto de energia, pois depende da ebulição do solvente para que tenha a extração dos compostos. Além disso, a alta temperatura, pode causar degradação dos metabólitos secundários, principalmente alguns flavonoides e antocianinas (TOMASI, 2021).

4.2 Preparo dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

Foram preparados 4 combinações distintas de NADES, conforme apresentado na Tabela 1. Todas as combinações formaram misturas eutéticas líquidas e transparentes (Tabela 2).

Tabela 2-NADES solubilizados em 20% de H₂O e os aspectos das misturas eutéticas

ID	NADESs	Abreviatura	Obs
NADES 1	Cloreto de Colina: Ácido Lático (1:1)	ChCl:LA (1:1)	Transparente, sem cor
NADES 2	Cloreto de Colina: Ácido Lático (1:3)	ChCl:LA (1:3)	Transparente, sem cor
NADES 3	Cloreto de Colina: Glicose (1:1)	ChCl:Glu (1:1)	Transparente, sem cor
NADES 4	Ácido Málico: Sorbitol (1:1)	MA: Sor (1:1)	Transparente, sem cor

A escolha das combinações dos NADES foi baseada em uma consulta prévia na literatura científica, em que relatam a utilização desses NADES para extração de compostos fenólicos (SOUZA *et al.*, 2021; RAMALHÃO, 2022)

Como descrito anteriormente na seção 3.2, a diluição dos NADES com 20% de água (m/m) foi realizado para diminuir a viscosidade das misturas e conservar as estruturas moleculares desses solventes que, segundo Dai e colaboradores (2015), quando os NADES são diluídos em proporções maiores que 50% de água, as ligações de hidrogênio entre os componentes são rompidas, ocasionando a perda das propriedades físico-químicas da mistura eutética, pois a mistura passa a se comportar como uma solução (DAI *et al.*, 2016).

4.3 Avaliação dos solventes eutéticos naturais (NADES)

As extrações com o NADES foram avaliadas pelo sistema CLAE-DAD para a determinação da eficiência das extrações (Figura 11), utilizando as áreas dos compostos-alvo como resposta (Figura 12), como realizado nas extrações convencionais discutidas na seção anterior.

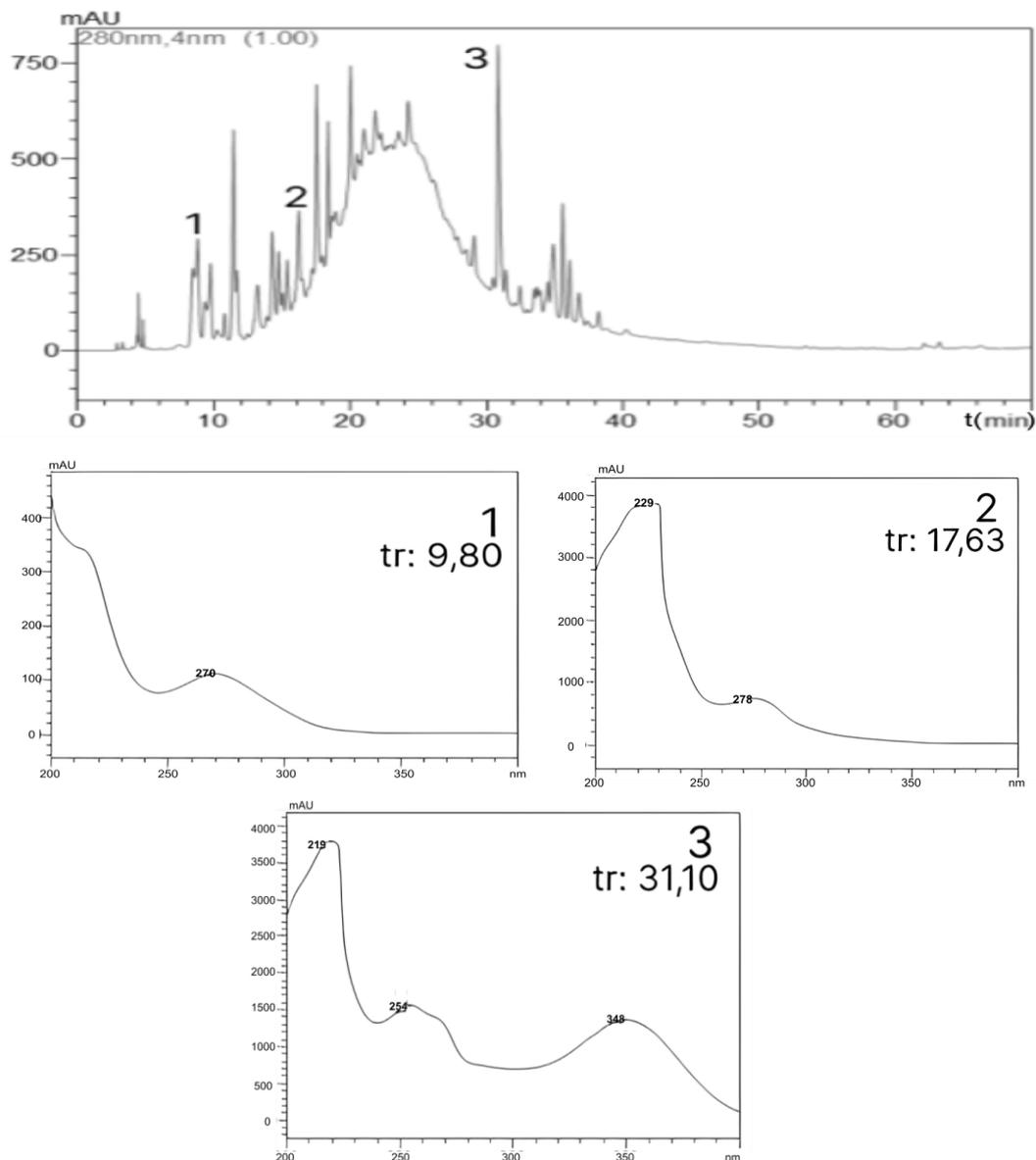


Figura 11- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD dos compostos fenólicos do NADES 2 ácido láctico: cloreto de colina (1:3) dos extratos das folhas de goiabeira. 1- ácido gálico (tempo de retenção 9,80 min, detecção a 270 nm), 2- catequina (tempo de retenção 17,63 min, detecção a 229 e 278 nm) e rutina (tempo de retenção 31,10, detecção a 219, 264 e 349 nm).

Fonte: Autoria própria

O NADES baseado em cloreto de colina e ácido láctico (1:3, mol/mol; NADES 2; Tabela 1) teve maior rendimento de extração dos compostos-alvo. Isto pode estar relacionado, como fato de que a mistura de cloreto de colina e ácido láctico na proporção 1:3, mol/mol, ser a mistura de

menor viscosidade em relação aos outros NADES avaliados (Tabela 1), e com isso, este é capaz de transportar uma maior quantidade de massa (SOUZA et al., 2020)

Após determinado o processo de extração convencional e o NADES mais eficientes na extração dos compostos-alvo das folhas de *P. guajava*, procedeu-se a comparação entre esses dois processos e, com isso, constatou-se que a extração verde, utilizando o NADES 2 como solvente, demonstrou maior eficiência do que o processo convencional ao evidenciar as maiores áreas dos compostos-alvo quando analisados por CLAE-DAD (Figura 13).

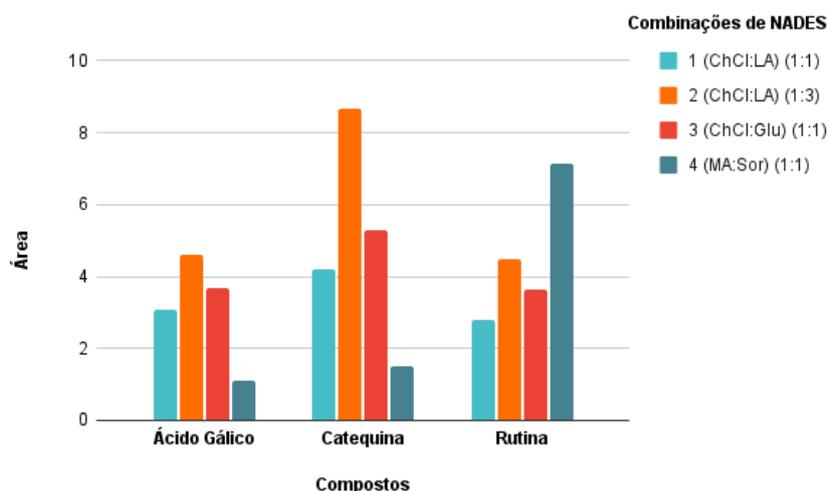


Figura 12-Extração dos compostos fenólicos nas combinações de NADES

Fonte: Autoria própria

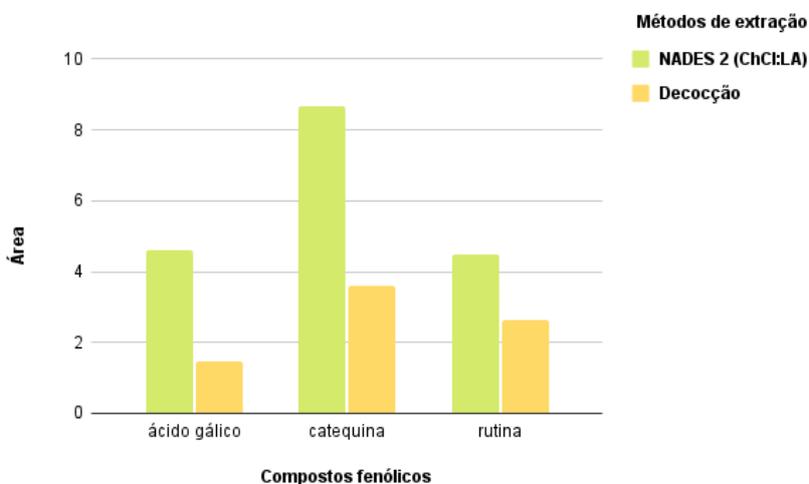


Figura 13-Comparação entre os métodos eficientes de extração (NADES e decocção) dos compostos fenólicos

Fonte: Autoria própria

Além disso, foi possível observar que, dentre os compostos-alvo avaliados, o ácido gálico foi o composto fenólico presente em maior quantidade (Figura 14). É importante ressaltar que como utilizamos a técnica de absorção da radiação ultravioleta podemos relacionar diretamente a quantidade dos compostos-alvo com a área obtida nos cromatogramas pelo fato de que a área das bandas cromatográficas é diretamente proporcional à concentração da substância de acordo com a Lei de Lambert-Beer (PAVIA; KRIZ, 2010).

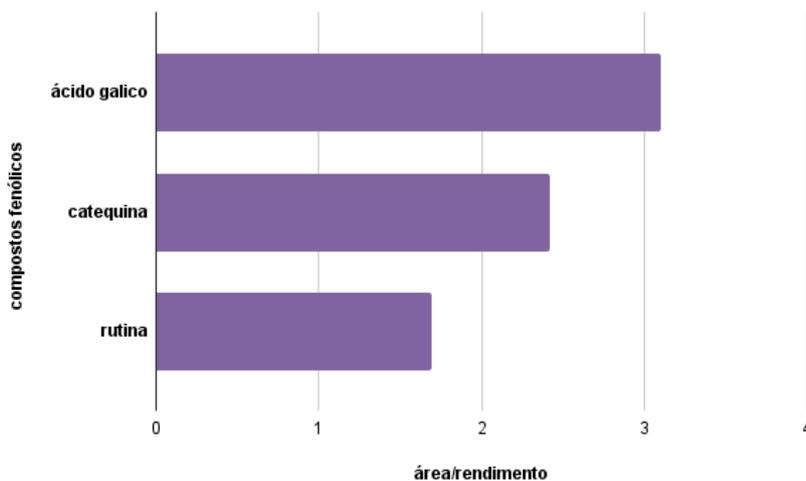


Figura 14- Composto fenólico com maior área/rendimento nas extrações NADES 2 (ChCl:LA) e decocção
Fonte: Autoria própria

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante este trabalho foi obtida a identificação parcial de três compostos fenólicos presentes na folha de *P. guajava*, relacionando os métodos convencionais encontrados na literatura com os métodos da Química Orgânica, sobretudo o uso de NADES.

De acordo com os dados parciais obtidos neste trabalho, o NADE derivado de cloreto de colina e ácido láctico (1:3, mol/mol) mostrou-se mais efetivo do que os processos tradicionalmente utilizados na literatura científica e farmacopeias para extração de ácido gálico, catequina e rutina das folhas de *P. guajava*.

Levando em consideração que os NADES possuem em sua composição substâncias naturais e de baixa toxicidade, podemos classificar previamente que o processo de extração com NADES utilizado neste trabalho foi mais verde e sustentável do que os convencionais avaliados. Os NADES são potenciais candidatos para a substituição de solventes orgânicos tóxicos convencionais, pois além da baixa toxicidade, são biodegradáveis e possuem alta capacidade de solubilização de substâncias devido a viscosidade ajustável.

Mais estudos serão necessários para embasar essa prévia conclusão, tais como planejamento de experimentos multivariados, análises estatísticas e métricas de comparação mais robustas.

Porém, esses dados preliminares demonstram que a migração de métodos de extração poluidores para métodos mais verdes não necessita de grandes modificações na instrumentação geralmente empregada, mas requer uma abordagem diferente no desenvolvimento do método e abrem caminho para que o setor industrial, a academia e instituições regulatórias revejam conceitos e valorizem processos eficientes, mas que, sobretudo considerem parâmetros ambientais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFRUTAS-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS. **Diferença entre goiaba branca e goiaba vermelha.** Disponível em: <https://abrafrutas.org/2022/03/qual-a-diferenca-entre-a-goiaba-branca-e-goiaba-vermelha-saiba-agora-mesmo/>. Acesso em: 15 dez. 2022.

BIRDI, Tannaz; DASWANI, Poonam; BRIJESH, S; TETAIL, Pundarikakshudu; NATU, Arvind; ANTIA, Noshir. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 10, ed. 33, p. 1-11, 2010.

BRASIL.Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Anuário estatístico do mercado farmacêutico.**Brasília: Anvisa, 2017.

BRITO, Thomas Amaral. **Estratégias de preparo de amostras empregando solventes eutéticos profundos naturais para determinação de contaminantes inorgânicos em amostras vegetais e alimentícias.**2022. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto-SP, 2022.

CHOI, Young Hae *et al.* Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?. **Scientific Correspondence**. v. 156, p. 1701-1705, 2011.

CRUZ, Ellen Shirmene Souza. **Utilização de Solventes Eutéticos na Extração de Compostos Bioativos da *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.**2018. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) - Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 2018.

DAI, Yuntao *et al.* Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50-56, 2016.

DAI, Yuntao *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14-19, 2015.

DURÃES, Emanuelle R. B. *et al.* Gênero *Psidium*: Aspectos Botânicos, Composição Química e Potencial Farmacológico. **Revista Processos Químicos**, v. 9, ed. 17, p. 33-40, 2015.

EMBRAPA.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos. **Qualidade em plantas medicinais**. 1. ed. Aracaju-SE. 2010.

GADELHA, Claudia Sarmiento *et al.* Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, ed. 5, p. 208-212, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA: Plantas Medicinais. 6. ed. Brasília, 2019. 745 p. v. 6.

FERREIRA, V. F. Química Verde, Economia Sustentável e Qualidade de Vida. **Revista Virtual de Química**, v. 6, ed. 1, p. 85-111, 2013.

FERREIRA, Marcel da Silva. **Otimização de Solução Extrativa e Desenvolvimento Tecnológico de Produto Seco por Aspersão de *Psidium guajava* L.** 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2009.

FIRMO, Wellyson C. A. *et al.* Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90-95, 2011.

IBGE. **Produção de goiaba**. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/goiaba/br>. Acesso em: 18 fev. 2023.

KLAN, Haroon; RAUF, Abdur. Medicinal Plants: Economic Perspective and Recent Developments. **World Applied Sciences Journal**, v. 31, n. 11, p. 1925-1929, 2014.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. da; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARÃES, D. P. (Ed.). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: produtos de origem vegetal**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v. 2, cap. 25, p. 839-866.

LENARDÃO, Eder J. *et al.* "Green Chemistry"- Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. **Química Nova**, v. 26, ed. 1, p. 123-129, 2003.

MAGALHÃES, Bárbara E. A.; SANTOS, Walter N. L. **Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais**. Separata de: Produtos Naturais e Suas Aplicações da comunidade para o laboratório. Editora Científica Digital, 2021. cap. 15, p. 235-247.

MELO, Bianca Paiva Zanchetta Camargo *et al.* **A Goiabeira (Psidium Guajava L.) na Fitoterapia Brasileira.** 2020. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, 2020.

MEU POMAR. **Produtos: Goiaba.** Disponível em: http://www.meupomar.com.br/ver_produto/produto/30/Goiaba. Acesso em: 15 dez. 2022.

METWALLY, A. M.; OMAR, A.A; HARRAZ, F.M; EL SOHAFY, S.M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, ed. 23, p. 212-218, 2010.

PADRO, Alexandre G. S. Química Verde, os Desafios da Química do Novo Milênio. **Química Nova**, v. 26, ed. 5, p. 738-744, 2003.

RAMALHÃO, Vitória Giovanna da Silva. **Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração dos compostos polifenólicos de *Passiflora edulis* Sims.** Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2022.

PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; L., G. M. **Introdução À Espectroscopia** - Tradução da 4a Edição Norte-americana. Editora: Cengage Learning. 2010.

PRADO, Alexandre G. S. Química Verde, os desafios da química no novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

RIBEIRO, Charles Lima *et al.* Propriedades farmacológicas de espécies dos gêneros: *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium* – *Myrtaceae*-, típicas do Cerrado: Uma revisão de escopo. **Research, Society and Development**, v. 11, ed. 8, p. 1-19, 2022.

ROCHA, Sthefanie Felix *et al.* Aspectos característicos, químicos e funcionais da espécie *Psidium guajava* L.: um estudo bibliográfico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 8, ed. 4, 2020.

ROSSI, Pedro Henrique Silva *et al.* Biodiversidade das Plantas Medicinais: benefícios e riscos. **Revista PubSaúde**, ed. 5, p. 1-5, 2021.

SANTANA, Ana P. R. *et al.* Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES) no preparo de amostras de rocha fosfática e suplemento mineral para determinação elementar por técnicas. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 689-695, 2021.

SANTOS, Walter N. L. *et al.* Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 583-592, 2017.

SAVI, Lizandra K. **Desenvolvimento de Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES) e o Estudo de Suas Propriedades Físico-Químicas, Térmicas e Reológicas.** Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk. 2019. 83 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2019.

SILVA, Elizabeth Aparecida Josefi. **Composição Química e Atividade Antifúngica do Óleo Essencial das Folhas de *Psidium guajava* no Controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.** 2020. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) - Instituto Federal de Educação e Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde-GO, 2020.

SILVA, Flávia Martins *et al.* Desenvolvimento Sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, ed. 1, p. 103-110, 2005.

SIQUEIRA, Priscila Becker *et al.* O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, ed. 4, p. 491-498, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Flavonoides e Antocianos.** 2009. Disponível em: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html. Acesso em: 16 jan. 2023.

SOUZA, Otávio Aguiar. **Abordagem Verde e Multivariada para Extração e Análise de Metabólitos Fenólicos de *Eugenia Uniflora* L.** Utilizando Solventes Eutéticos Naturais Profundos (NADES).2020. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP, 2020.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development.** New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

TOMASI, Maria L. M. **Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).**2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

TRINDADE, Janaina Kiara Miranda. **Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas de Variedades de *Psidium guajava***.2019. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química Industrial) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara-AM, 2019.

UNGER, Janaina Chagas. **Solventes Eutéticos Naturais Profundos como alternativa aos solventes orgânicos na extração de terpenos bioativos de *Casearia sylvestris* Swartz**. 2022. 55 p. Trabalho de Conclusão (Farmácia Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara-SP, 2022.

ZAGO, Leciana Menezes Sousa. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, ed. 1, 2018.

ZARDETO-SABEC, Giuliana *et al.* Plantas Medicinais como Alternativa no Tratamento do Câncer. **Brazil Journal of Surgery and Clinical Research**, [s. l.], v. 27, ed. 3, p. 75-80, 2019.