



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM COSSOLVENTE SOBRE O  
TEOR DE L-DOPA DO EXTRATO DE *MUCUNA PRURIENS* TESTADOS EM  
MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON**

**MARIA CAROLINE RODRIGUES FERREIRA**

**BELÉM – PA**  
**2019**

**MARIA CAROLINE RODRIGUES FERREIRA**

**EFEITO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM COSSOLVENTE SOBRE O  
TEOR DE L-DOPA DO EXTRATO DE *MUCUNA PRURIENS* TESTADOS EM  
MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação final apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

**BELÉM – PA  
2019**

**MARIA CAROLINE RODRIGUES FERREIRA**

**EFEITO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM COSSOLVENTESOBRE O  
TEOR DE L-DOPA DO EXTRATO DE *MUCUNA PRURIENS* TESTADOS EM  
MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON**

**Data da Avaliação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nota/ Conceito:** \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior**  
**(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Silva de Oliveira**  
**(UEPA- Co-orientadora)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geormenny Rocha dos Santos**  
**(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Anderson Bentes de Lima**  
**(UEPA- Membro Externo)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>o</sup>. Nelson Rosa Ferreira**  
**(PPGCTA/ITEC/UFPA – Suplente interno)**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Silva Helena Marques**  
**(Instituto Evandro Chagas – Suplente externo)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e do conhecimento e por iluminar o meu caminho durante esta caminhada.

Agradeço a minha família pelo amor, apoio e incentivo incondicional. Mãe, seu cuidado e dedicação deram, em muitos momentos, a coragem para seguir. Camila, sua presença significa segurança e certeza de que nunca estarei sozinha nessa caminhada. E Pai, meu amor eterno e maior saudade, que onde quer que esteja, nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim. E a toda minha família que acreditou e torceu por mim. Obrigada, pois sem vocês este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

Ao meu namorado, Gustavo, que de forma paciente e carinhosa me incentivou e encorajou em todos os momentos.

Aos meus amigos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

Meus agradecimentos aos colegas do Laboratório de Extração (LABEX), companheiros e parceiros que compartilharam seus conhecimentos de maneira tão produtiva. Obrigada pelo convívio, amizade e apoio demonstrado. A ajuda de vocês foi essencial para esse trabalho.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo suporte e aos participantes da banca examinadora pelas avaliações e contribuições realizadas ao longo desse trabalho.

Ao Professor Dr<sup>o</sup>. Fábio Gomes Moura, assim como aos pesquisadores Bruno Brito, Luís Teixeira, Carlos Barros, Amanda Rodrigues, Daniel do Nascimento, Renata Silva, Guilherme Oeiras, Letícia Coelho, Patrícia Nogami e Jadson da Poça pelas contribuições e suporte. Aos laboratórios parceiros do Centro de Valorização de Compostos Bioativos (CVACBA/PCT/UFGA) e Laboratório de Análise morfológica (UEPA), por abrirem as portas e proporcionarem os meios necessários para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Agradeço de maneira especial o meu orientador Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Raul Nunes de Carvalho Júnior e a co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Silva de Oliveira pelos ensinamentos, orientações, contribuições e por acreditarem no potencial dessa pesquisa.

Ao CNPq pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

*“'Não há rosa sem espinhos' é um provérbio melancólico.  
Digamos em vez disso: 'Não há espinhos sem rosas'”.*

**Chiara Lubich**

## RESUMO

As sementes de *Mucuna pruriens* contém o composto bioativo L-dopa (precursor do neurônio dopamina), um constituinte fenólico que confere diversas propriedades alopáticas a esta espécie, especialmente para o tratamento da doença de Parkinson. Neste estudo, avaliou-se o efeito da extração supercrítica sobre o teor de L-dopa do extrato de *Mucuna pruriens* testados em modelos animais da doença de Parkinson. A obtenção de extratos de *Mucuna pruriens* foi realizada por extração supercrítica associando dióxido de carbono a etanol como co-solvente polar. Os testes foram realizados a temperaturas de 40 e 60°C e pressões de 150, 250 e 350 bar. Os rendimentos variam de 2,56% a 3,70%, onde o menor rendimento foi da condição de 40°C, 150 bar e 860,8 kg/m<sup>3</sup> e o rendimento máximo de extrato foi obtido na condição a 60°C, 350 bar e densidade igual a 912,8 kg/m<sup>3</sup>. A análise de compostos fenólicos foi realizada na amostra *in natura*, nas tortas pós-extração e nos extratos. O total de compostos fenólicos presentes na amostra *in natura* foi de 45,20 mg AG/g. A torta com menor quantidade de compostos fenólicos foi a resultante da extração de 40°C e 350 bar (55,04 mg AG/g) e o maior resultado foi encontrado na torta de 60°C e 150 bar (62,50 mg AG/g). O extrato com menor teor de compostos fenólicos (55,58 mg AG/g extrato) foi obtido com 40° C a 150 bar, enquanto que a melhor condição de operação de extração em termos de conteúdo fenólico foi 60° C a 350 bar (82,25 mg AG/g extrato). Os menores teores de compostos fenólicos da torta pós-extração e os maiores teores dos extratos foram obtidos nas condições de maiores rendimentos mássicos de extração, indicando que o processo de extração influenciou positivamente neste parâmetro. A análise HPLC comprovou a presença do composto L-dopa nas sementes *in natura*, nas tortas pós extração e nos extratos obtidos das extrações supercríticas. A extração supercrítica aumentou o conteúdo desse composto bioativo nas tortas pós-extração, devido a extração de outros compostos que aumentou a sua concentração. A torta resultante da condição de 40°C e 250 bar foi a que apresentou menor teor de L-dopa com 29,66 mg/g e os maiores teores de L-dopa foram detectados nas condições de 60°C e 150bar, com 35,83 mg/g. A extração de L-dopa foi melhor pelas condições de 40 e 60°C e 350 bar, com 0,43 e 0,41 mg/g de extrato. Os testes *in vivo* simulando as desabilidades motoras promovidas pela redução de dopamina estriatal presentes na doença de Parkinson, comparando os tratamentos feitos com L-dopa artificial e L-dopa natural de *Mucuna*. Os resultados mostraram que, apesar de o tratamento com Levodopa comercial surtir maiores resultados, houve uma melhora motora e de equilíbrio nos testes de grade vertical e campo aberto, comprovaram que o

extrato obtido por extração com fluido supercrítico teve um efeito positivo sobre os modelos animais de doença de Parkinson.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Mucuna pruriens</i> .....	19
<b>Figura 2:</b> Estrutura L-dopa.....	22
<b>Figura 3:</b> Esquema de metabolização da L-dopa em humanos.....	22
<b>Figura 4:</b> Enantiômeros da dopa.....	23
<b>Figura 5:</b> Produção normal de dopamina no sistema nervoso centra.....	25
<b>Figura 6:</b> Fluxograma metodologia.....	36
<b>Figura 7:</b> Unidade de extração supercrítica (Applied Separations).....	39
<b>Figura 8:</b> Diagrama esquemático de Spe-edTM EFS.....	39
<b>Figura 9:</b> Isotermas de rendimento mássico global versus pressão das EFS.....	48
<b>Figura 10:</b> Isotermas de rendimento mássico global versus densidade das EFS.....	49
<b>Figura 11:</b> Teste de grade vertical – tempo de virada.....	59
<b>Figura 12:</b> Teste de grade vertical – tempo total de teste.....	60
<b>Figura 13:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa nas sementes in natura..	79
<b>Figura 14:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 150 bar.....	79
<b>Figura 15:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 150 bar.....	80
<b>Figura 16:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 250 bar.....	80
<b>Figura 17:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 250 bar.....	81
<b>Figura 18:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 350 bar.....	81
<b>Figura 19:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 350 bar.....	82

<b>Figura 20:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 250 bar – fase amostra.....	82
<b>Figura 21:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 250 bar – fase água + metanol.....	83
<b>Figura 22:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 250 bar – fase amostra.....	83
<b>Figura 23:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 250 bar – fase água + metanol.....	84
<b>Figura 24:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 350 bar – fase amostra.....	84
<b>Figura 25:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 350 bar – fase água + metanol.....	85
<b>Figura 26:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 350 bar – fase amostra.....	85
<b>Figura 27:</b> Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 350 bar – fase água + metanol.....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros variáveis aplicadas nos processos de extração: Temperatura e Pressão.....	30
<b>Tabela 2:</b> Densidade dos solventes e rendimento de extração referentes a cada temperatura e pressão.....	30
<b>Tabela 3:</b> Compostos fenólicos totais das tortas pós-extração e dos extratos e atividade antioxidante dos extratos das sementes de <i>Mucuna pruriens</i> obtidos das extrações supercríticas.....	40
<b>Tabela 4:</b> Concentração de L-dopa nas tortas pós-extração e nos extratos supercríticos de <i>Mucuna pruriens</i> .....	41
<b>Tabela 5:</b> Resultados testes de Campo aberto e de Grade vertical realizados em modelos animais de Doença de Parkinson.....	58

## LISTA DE ABREVIações

- $\epsilon$** : Porosidade do leito de extração;
- $\rho_a$** : Densidade aparente do leito;
- $\rho_r$** : Densidade real da partícula;
- BCA**: Bipedestação com apoio;
- bs**: Base seca;
- BSA**: Bipedestação sem apoio;
- CO<sub>2</sub>**: Dióxido de carbono;
- C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH**: Etanol;
- DEF**: Número de defecações;
- D-dopa**: D- 3,4-dihidroxifenilalanina;
- EFS**: Extração com fluido supercrítico;
- L-dopa**: L- 3,4-dihidroxifenilalanina;
- Levodopa**: L- 3,4-dihidroxifenilalanina;
- LIMPE**: Número de limpezas;
- M.**: Mucuna;
- Pc**: Pressão crítica;
- SNC**: Sistema nervoso central;
- Tc**: Temperatura crítica;
- TDESCIDA**: Tempo de descida;
- TRAVE**: Teste de trave;
- TVIRADA**: Tempo de virada;
- X<sub>0</sub>**: Rendimento global;
- TTOTAL**: Tempo total.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	IV
RESUMO .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	XI
LISTA DE ABREVIACÕES .....	XII
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBEJETIVO .....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.1.1 Objetivos específicos .....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1 <i>Mucuna pruriens</i> .....	18
3.2 Composto L-Dopa.....	21
3.3 Doença de Parkinson.....	24
3.4 Extração com Fluido Supercrítico (EFS) .....	29
4 METODOLOGIA .....	36
4.1 Matéria-prima .....	37
4.2 Caracterização da matéria-prima .....	37
4.3 Caracterização do leito de extração .....	37
4.3.1 Determinação do diâmetro da partícula .....	37
4.3.2 Determinação da densidade real, densidade aparente e porosidade do leito .....	38
4.6 Extração com fluido supercrítico .....	38
4.6.1 <i>Condições operacionais</i> .....	40
4.6.3 <i>Cálculo de densidade</i> .....	40
4.6.4 <i>Concentração dos Extratos</i> .....	40
4.6.5 <i>Cálculos dos rendimentos globais de extração</i> .....	41
4.7 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais .....	41
4.8 Quantificação de L-Dopa.....	42
4.9 Testes in vivo .....	43
4.9.1 Distribuição dos grupos experimentais .....	43
4.9.2 Administração de 6-OHDA .....	43
4.9.3 Testes comportamentais.....	44
4.9.3.1 Teste do Campo Aberto.....	44
4.9.3.2 Teste da Grade Vertical .....	44

4.9.3.3 Teste rotacional com Apomorfina .....	44
4.10 <i>Análise estatística dos resultados</i> .....	45
5 RESULTADOS.....	45
CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO I .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

*Mucuna pruriens* é uma planta da família Fabaceae oriunda de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, mas também é amplamente distribuída na África e nas Américas, sendo cultivada no Brasil principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Algumas espécies desse gênero são utilizadas há muito tempo para o tratamento de doenças por possuir valiosas propriedades medicinais (DAHOUDA et al., 2009; LONGHI et al., 2011; MAJEKODUNMI et al., 2011; RAINA e KHATRI, 2011; CASSANI et al., 2016).

Estudos sugerem que as propriedades de *Mucuna pruriens* podem trazer benefícios à saúde, principalmente em relação a doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Parkinson, uma disfunção neurológica crônica causada por uma progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos que afeta principalmente as funções motoras, causando uma série de prejuízos à saúde. No passado, esta síndrome já era tratada com medicamentos ayurvédicos (medicina tradicional indiana) obtidos de produtos naturais, como as sementes de *Mucuna* devido à sua possível ação sobre o sistema nervoso central, por conter em suas folhas, raízes e sementes, um composto bioativo, o aminoácido L-dopa (L-3,4-dihidroxi-fenilalanina), relatado como um potente precursor de um importante neurotransmissor cerebral, a dopamina (NISHIHARA et al., 2005; RAJESHWAR, et al., 2005; KOSTRZEWA et al., 2005; RANDHIR, et al., 2006; SATHIYANARAYANAN et al., 2007; SRIDHAR et al., 2007; NAGATSUA et al., 2009; OVALATH e DEEPA, 2013; JANSEN et al., 2014; ABUSHOUK et al., 2017; GANDHI e VAIDYA, 2017).

A extração é um passo importante envolvido na recuperação de compostos bioativos de materiais vegetais e vem ganhando destaque em virtude do interesse por produtos naturais nas mais variadas indústrias, principalmente farmacêutica e alimentícia, visando agregar valor aos produtos elaborados, gerando a necessidade de técnicas de extração com maiores rendimentos e boa qualidade do produto obtido. Dentre os métodos convencionais que podem ser aplicados para extração de compostos, destaca-se a extração com fluido supercrítico, uma operação unitária, onde são empregados solventes acima de seus pontos críticos para extrair componentes solúveis de uma mistura, permitindo uma eficiente remoção das substâncias de interesse (CARVALHO JR et al., 2005; HERRERO et al., 2013; FERREIRA et al., 2013, GALLEGO, BUENO e HERRERO, 2019).

O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado na extração em condições supercríticas, ideal para aplicação em produtos naturais. Suas características o classificam como uma substância apolar, logo, é principalmente usado para extrair compostos apolares. No entanto, compostos polares, como L-dopa, apresentam solubilidade reduzida no CO<sub>2</sub> supercrítico e a elevada seletividade desse solvente em estado supercrítico torna necessária a adição de um cossolvente polar (ROSA et al., 2009; HUISDEN et al., 2010; GARCIA et al., 2013; PEREIRA et al., 2016). Para tal, a polaridade do CO<sub>2</sub> pode ser melhorada através da associação com etanol, que é considerado um solvente polar de qualidade alimentar, sendo mencionado também como um "solvente verde" (OSORIO-TOBÓN & MEIRELES, 2014).

Estudos científicos já atestaram que o extrato natural de *Mucuna* é mais potente que a L-dopa sintética e diversas técnicas para extrair este composto a partir desta espécie já foram testadas para a preparação de formulações farmacêuticas para o tratamento da doença de Parkinson registrando resultados positivos. Sendo assim, a terapia baseada em sementes de *Mucuna* pode se tornar uma alternativa viável aos medicamentos com L-dopa artificial. Contudo, a desvantagem do tratamento utilizando o pó das sementes de *Mucuna* e dos extratos obtidos de maneira mais rústica é a necessidade de consumir grande volume de massa para obter-se níveis suficientes de L-dopa, causando efeitos colaterais indesejáveis. A fim de driblar esta inconveniência, sugere-se a aplicação da técnica de extração com fluido supercrítico para remoção mais eficiente do composto de interesse, variando e facilitando a maneira de ser aplicado para o tratamento de Doença de Parkinson (KASTURE et al., 2009; LIEU et al., 2012b; YADAV et al., 2014).

Embora já existam extensas publicações de pesquisa na literatura sobre obtenção, caracterização e atividades farmacológicas dos extratos de semente de *Mucuna pruriens*, ainda faltam estudos voltados para a otimização de extração utilizando a técnica de extração supercrítica.

## 2 OBEJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da extração supercrítica com cossolvente sobre o teor de L-dopa do extrato de *Mucuna pruriens* testados em modelos animais da doença de Parkinson.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Obter de extratos a partir das sementes de *Mucuna pruriens* aplicando solvente supercrítico (CO<sub>2</sub>) e cossolvente (etanol);
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais da amostra *in natura*, das tortas pós-extração e dos extratos obtidos das extrações com fluido supercrítico;
- Quantificar o composto L-dopa da amostra *in natura*, das tortas pós-extração e dos extratos obtidos das extrações com fluido supercrítico;
- Determinar os melhores parâmetros de extração com base no maior conteúdo de L-Dopa no extrato obtido via fluido supercrítico;
- Avaliar o efeito do composto L-dopa presente extrato supercrítico de *Mucuna pruriens* em teste de indução da doença de Parkinson (teste *in vivo*).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Mucuna pruriens*

A espécie *Mucuna pruriens* (L.) Dc. pertence da família Fabaceae, que cresce espontaneamente no ambiente tropical e áreas subtropicais do mundo, especialmente Índia e Ásia, mas também na América do Sul (UMOREN et al., 2008; HUISDEN et al., 2010; RAINA e KHATRI, 2011; PATIL et al., 2015; CASSANI et al., 2016). No Brasil, os grãos são cultivados principalmente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e têm valor comercial para a agricultura autossustentável de pequenos agricultores (NWAOGUIKPE, BRAIDE e UJOWUNDU, 2011). Dependendo da região é conhecida popularmente como Mucuna preta, mucuna-anã, mucuna rajada, feijão-veludo, feijão-de-búfalo, feijão-cabeludo-da índia, feijão-de-gado, entre outros, devido a sua semelhança estética com o feijão (RAJESHWAR et al., 2005; PUGALENTHI, VADIVEL e SIDDHURAJU, 2005; AERON et al., 2012, PATIL et al., 2015).

Mucuna é uma leguminosa anual ou bianual, cultivada da primavera até o outono, podendo ser intercalada com outras culturas, afim de aumentar a produtividade, diminuindo a infestação de plantas daninhas e de pragas. É uma trepadeira, de porte baixo, com galhos longos e finos e inflorescências de racemos, com flores com colocação do branco ao roxo escuro que pendem em longos cachos. A planta produz vagens que são cobertas com pelos laranja-avermelhado, que, quando entram em contato com a pele, causa intensa irritação e coceira e, às vezes, lesões cutâneas como alergias e inchaço devido a presença de um fitoquímico conhecido como mucunaína e no seu interior encontram-se as sementes, como ilustrado na Figura 1. Esta espécie se desenvolve melhor em condições quentes e úmidas, por serem sensíveis às geadas e crescer mal em solos frios e úmidos. Contudo, é bastante resistente a uma série de estresses abióticos, como seca, baixa fertilidade e alta acidez do solo (FAROOQ et al., 2011; LAMPARIELLO et al., 2012; RAINA, TOMAR, DUTTA, 2012; CASSANI et al., 2016).



**Figura 1:** *Mucuna pruriens*  
**Fonte:** BRSEEDS

A espécie *Mucuna* é relevante para a produção agrícola por possuir características agronômicas desejáveis, como rápido crescimento, que garante grande produção de massa verde e algumas espécies podem evitar a multiplicação de nematoides (vermes parasitas) no solo, visto que as raízes dessa planta são bastante resistentes, diminuindo a população dessa praga no terreno. Por este motivo, no Brasil, tem sido cultivada para adubação verde em solos arenosos pobres e para a alimentação animal, pois seus grãos triturados constituem um rico suplemento proteico (GONZÁLEZ et al., 2008; DAHOUDA et al., 2009; FAROOQ et al., 2011; AERON et al., 2012; SHAVE, TER-RUMUM E ENOCH, 2012). Apesar de seu potencial, as sementes de *Mucuna* continuam sendo uma cultura alimentar pouco utilizada na alimentação humana e até mesmo para ração animal devido à presença de compostos antinutricionais, incluindo alguns grupos fenólicos, taninos, lectinas, ácido fítico e inibidores da tripsina, por exemplo, que podem afetar de maneira negativa o sistema gastrointestinal. Na Índia, as sementes maduras são tradicionalmente consumidas por grupos étnicos aplicando métodos simples de processamento das sementes como imersão, cozimento, descascamento, secagem e moagem que causam redução significativa desses compostos indesejáveis, possibilitando seu uso como ingredientes em várias preparações, mas que podem afetar de maneira negativa a aceitação sensorial devido a alteração de sabor (BHAT, SRIDHAR, TOMITA-

YOKOTANI, 2007; BETANCUR-ANCONA et al., 2008; GURUMOORTHY, JANARDHANAN e MYHRMAN, 2008; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009; KALA e MOHAN, 2012; VADIVEL e BIESALSKI, 2012; NGATCHIC et al., 2013).

Embora todas as partes da planta possuam propriedades medicinais, grande importância foi atribuída às sementes que contém significativas concentrações de compostos bioativos, macro e microconstituintes importantes que as tornam uma fonte nutritiva viável, como proteínas, carboidratos, gorduras e fibras, bem como um perfil de aminoácidos muito rico. Além de inúmeras substâncias químicas como minerais, compostos fenólicos, taninos, ácido fítico, ácidos graxos, alcaloides e vitaminas, sendo a L-dopa o constituinte fenólico de maior concentração que confere diversas propriedades alopáticas a esta espécie. Essas substâncias (e outras ainda não identificadas) podem conferir maior propriedade terapêutica às sementes de *Mucuna*, talvez potencializando os efeitos da levodopa, adicionando algum tipo de agonismo ou até mesmo estendendo seus efeitos, melhorando a eficiência metabólica (ADEBOWALE et al., 2005; SATHIYANARAYANA e ARULMOZHI, 2007; PUGALENTHI, VADIVEL e SIDDHURAJU, 2007; NATARAJAN, NARAYANAN e RAVICHANDRAN, 2012; OJIAKO et al., 2012; KASTURE, MAHALAXMI MOHAN e KASTURE, 2013; CASSANI et al., 2016).

O composto L-dopa é encontrado nas sementes de diversas famílias de plantas, usado para tratar distúrbios neuronais como Doença de Parkinson. Contudo, a espécie *Mucuna pruriens*, que já era bastante usada na medicina Ayurveda, o antigo sistema médico da Índia para combater doenças e é a única semente encontrada até hoje com teor de L-dopa suficiente para garantir uma possível produção comercial (GAUTAM, CHANDEL e AZMI, 2012; OVALLATH e DEEPA, 2013, JASEN et al., 2014; GANDHI e VAIDYA, 2017). Além de ser usada para o tratamento de doença de Parkinson, a espécie *Mucuna* também melhora a adaptação e regeneração dos tecidos em geral, aumenta o hormônio do crescimento, possui efeito anabólico e aumenta a massa muscular. Melhora a qualidade do sêmen, dos espermatozoides e aumenta a libido ou impulso sexual em homens e mulheres devido ao seu efeito indutor de dopamina. Tem efeito positivo sobre diabéticos e pessoas com colesterol alto. Favorece as funções protetoras do fígado, protege o estômago de lesões na mucosa gástrica, aumenta o peristaltismo intestinal e tem um bom efeito sobre a constipação, comum em pacientes com doença de Parkinson. Age contra picadas de cobra, porque é pró-coagulante e previne

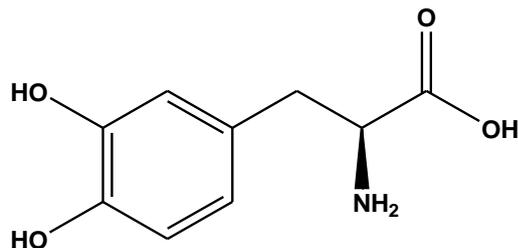
a depressão cardiorrespiratória induzida por veneno. Além das propriedades antioxidantes, relacionadas principalmente à presença do composto L-dopa, que podem trazer benefícios à saúde, como tratamento para diferentes doenças mediadas por radicais livres, relacionadas ao envelhecimento, principalmente em relação as diversas doenças neurodegenerativas, uma vez que o cérebro possui uma alta sensibilidade aos danos oxidativos (KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2010; MAJEKODUNMI et al., 2011; DHARMARAJAN e ARUMUGAM, 2012; SURESH e PRAKASH 2012; GOLBABAPOUR et al., 2013; YADAV et al., 2013; OBOGWU, AKINDELE e ADEYEMI, 2014; YADAV et al., 2014). Recentemente, o efeito do extrato de *Mucuna pruriens* obtido via dióxido de carbono supercrítico foi avaliado no crescimento tumoral em ratos, indicando que o extrato inibiu o crescimento e desenvolvimento de câncer cerebral (CUNHA et al., 2018).

### 3.2 Composto L-dopa

Os compostos fenólicos são classificados com um grupo variado de substâncias que apresentam como característica comum a presença de pelo menos um anel aromático em que no mínimo um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila livre ou outra função derivada (éster ou heterosídeo) (CARVALHO et al., 2016). Possuem diversos efeitos benéficos à saúde humana devido, principalmente, às funções biológicas, incluindo capacidade antioxidante, evitando danos ao organismo humano e prevenindo patologias através de diferentes mecanismos (LEOPOLDINI et al., 2011; CAROCHO E FERREIRA, 2013). São compostos com grande aplicação industrial e por esta razão são amplamente estudados para identificar, quantificar e isolar a partir de espécies vegetais (IGNAT et al., 2011, THÓMAS-BARBERAM e ANDRES-LACUEVA, 2012).

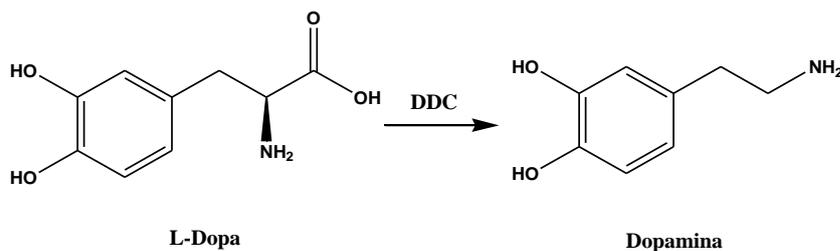
O interesse sobre as substâncias presentes nas sementes de *Mucuna pruriens* está principalmente relacionado às suas possíveis ações sobre o sistema nervoso central (SNC), por conter em suas folhas, sementes e raízes o composto fenólico L-dopa ou Levodopa (L- 3,4-dihidroxifenilalanina), um aminoácido não proteico incomum presente em várias leguminosas e não sintetizada no corpo do animal (Figura 2). Em 1937, a levodopa foi isolada das sementes de *Mucuna* e sua concentração foi estimada em aproximadamente 4-6% e desde então a demanda por este agente alelopático vem crescendo continuamente (DAMODARAN e RAMASWAMY, 1973; MANYAM et al., 2004; MANYAM et al., 2005; MELO et al., 2005; SATHIYANARAYANAN e

ARULMOZHI, 2007; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009; KASTURE, MAHALAXMI MOHAN e KASTURE, 2013; OVALLATH e DEEPA, 2013).



**Figura 2:** Estrutura L-dopa

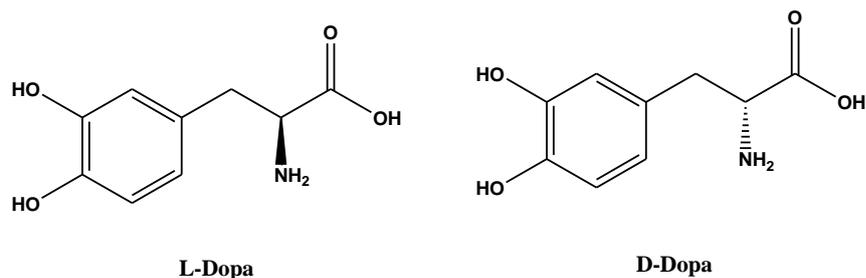
Este composto é o precursor de um importante neurotransmissor, a dopamina, metabolizada nos tecidos cerebrais por processos de descarboxilação pela ação de uma enzima chamada dopa-descarboxilase (DDC), conforme a Figura 3, em seguida é transportada através dos tecidos cerebrais para o sistema nervoso central (SIMUNI et al., 2008; SURWASE et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2013). Por este motivo a L-dopa é o fármaco mais utilizado para o tratamento da doença de Parkinson, relacionado a deficiência de dopamina no cérebro (JANSEN et al., 2014; CASSANI et al., 2016). Ademais, também é precursor dos hormônios adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina) (SIMUNI e HURTIG, 2008; VILHENA et al, 2014).



**Figura 3:** Esquema da metabolização de L-dopa em humanos  
**Legenda:** DDC- dopa descarboxilase

A estrutura da molécula influencia diretamente na sua ação, visto que compostos com estereocentros (carbono assimétrico) podem apresentar efeitos farmacológicos diferentes. A dopa apresenta dois enantiômeros (moléculas que são imagens no espelho uma da outra e não são sobreponíveis, nem por rotação, nem por translação): a L-dopa (ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil) e a D-dopa (ácido (R)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil), representados na Figura 4. Alguns trabalhos, testados *in vivo*, relatam que a D-Dopa produziu efeito positivo similar ao alcançado pela L-dopa em relação ao tratamento da DP. Todavia, os efeitos colaterais indesejáveis foram mais frequentes com

a D-dopa, por isso a necessidade de o medicamento conter especificamente o composto L-Dopa (BLANCO, 2003; WU, 2006).



**Figura 4:** Enantiômeros da dopa

Variação nas atividades biológicas dos extratos obtido de sementes de *Mucuna* a partir de diferentes técnicas de extração já foram anteriormente relatados, portanto, a seleção do método de extração adequado é importante para obter os extratos com elevadas atividades farmacológicas. O processo de extração deve levar em consideração as condições de oxidação do composto L-dopa que dependente do pH (em condições ácidas o composto é relativamente estável, enquanto que em solução básica a oxidação ocorre mais rapidamente), da temperatura (faixa de degradação entre 70-100°C), além de oxidar-se facilmente na presença de solventes tóxicos. Por este motivo, a extração envolvendo solventes supercríticos mostra-se uma boa alternativa para a aplicação nas sementes de *Mucuna*, visto que evita a degradação de produtos importantes (ADEBOWALE et al., 2005; GARCÍA-RISCO et al., 2011; GARCIA et al., 2012).

A otimização do processo de extração de levodopa e sua quantificação são importantes para evitar a ingestão de quantidades excessivas que podem levar a uma série de reações adversas e indesejáveis nos pacientes. Atualmente, medicamentos à base de l-dopa vêm sendo usados sem controle muito rigoroso, pois é considerado relativamente seguro (embora haja riscos se mal utilizado), visto que a maioria das formulações vendidas contém doses muito baixas do composto, consumidas como uma espécie de suplemento dietético. No entanto, o composto L-dopa também pode ser considerado um agente tóxico quando consumidos de maneira inadequada e nem os pacientes nem os médicos têm ideias totalmente claras sobre essa planta, seus componentes (L-dopa e outros), as proporções nas quais são absorvidas ou como administrá-la. Em altas concentrações a dose é perigosa, podendo causar um aumento da concentração de dopamina nos tecidos periféricos, induzindo efeitos anti-fisiológicos como náusea, vômito, anorexia, delírios entre outros (CILIA et al., 2018).

### 3.3 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson é classificada como uma desordem neurológica degenerativa progressiva do sistema nervoso central relacionado a idade causada pela redução significativa nos níveis de dopamina. Se inicia a partir de um processo de degeneração de neurônios na substância negra mesencefálica, com consequente perda de função da via dopaminérgica nigroestriatal, diminuindo a neurotransmissão dopaminérgica para o corpo estriado. Atinge principalmente o sistema motor, causando danos à saúde como: redução da expressão facial, postura curvada, lentidão da movimentação voluntária, tremor ondulante em repouso, rigidez muscular e deficiência do equilíbrio postural. Contudo, não apenas o sistema nervoso é afetado, mas também outras áreas cerebrais são atingidas com a doença de Parkinson. Alguns fatores têm um papel crítico no desenvolvimento e na progressão da doença de Parkinson, como a idade e predisposição genética (RASCOL et al., 2011; OVALLATH e DEEPA, 2013; YADAV et al. 2013; ABUSHOUK et al., 2017 CARRETE, 2017).

Evidências sugerem que a patogênese da doença de Parkinson deve-se possivelmente ao estresse oxidativo e proteolítico elevados e a neuroinflamação que ocorrem normalmente em neurônios nigrosos que podem ser responsáveis pela degeneração dopaminérgica. Bem como pela formação de inclusões, caracterizadas pelo acúmulo irregular de proteína e pelo desenvolvimento de proteínas malformadas em um compartimento específico de neurônios, gerando respostas celulares ao estresse iniciado na presença destas proteínas contra o acúmulo tóxico, podendo levar a morte celular. A disfunção mitocondrial também pode desempenhar papéis importantes na degeneração neuronal dopaminérgica por ação de neurotoxinas que inibem a atividade do complexo mitocondrial. No entanto, estudos discutem também o papel dos agentes tóxico ambientais, como a exposição a pesticidas, fungicidas, toxinas, excesso de ferro, entre outros, que podem causar lesões na substância negra compacta, uma porção heterogênea do mesencéfalo responsável pela produção de dopamina no cérebro, induzindo alguns genes ou inibindo outros que contribuem na progressão da doença através de cascata de neuroinflamação. Além do mais, a síndrome pode ser induzida por drogas que afetam o sistema nervoso central, principalmente os antagonistas da dopamina (RAO et al., 2006; BERRY, VECCHIA e LA NICOTERA, 2010; STOWE et al., 2010; COOK, STETLER



melhor que a versão sintética e estudos pré-clínicos e clínicos sugeriram que o extrato em pó de MP poderia ser usado para melhorar o parkinsonismo com um perfil de segurança favorável (VAIDYA et al., 1978; LIEU et al., 2010b; LIEU et al., 2012b). Medicamentos à base de levodopa geralmente melhoram os sintomas dessa doença, pois produzem um acentuado aumento na concentração de dopamina no cérebro, restaurando a neurotransmissão. Na maioria dos casos, a mobilidade funcional pode ser mantida durante muitos anos e a expectativa de vida de pacientes tratados aumenta significativamente (HAUSER et al., 2010; LIEU et al., 2012b).

Níveis aumentados de dopamina circulante pela suplementação de MP em indivíduos saudáveis já foram anteriormente comprovados, possivelmente devido a presença de levodopa. Entretanto, a administração direta de dopamina não possui o mesmo efeito, visto que possui uma estrutura química que não lhe permite atravessar a barreira hematoencefálica, pois, para que uma molécula atravesse a barreira, ela deve ser pequena, lipofílica (apolar) ou um gás, como o composto L-dopa, que possui características que lhes permite atravessar a barreira. Portanto, seu precursor L-dopa é administrado por via oral e é prontamente absorvido pelo intestino e convertido em dopamina pela descarboxilase, aumentando as concentrações de L-dopa no cérebro. Logo, a dopamina produzida no sistema nervoso a partir da L-dopa é responsável pela eficácia terapêutica do fármaco na doença de Parkinson (DI STEFANO, SOZIO e CERASA, 2008; BROADLEY, 2010; RAINA et al., 2012, CASSANI et al., 2016; LIU et al., 2016).

A absorção da levodopa acontece rapidamente no intestino delgado mediante um sistema de transporte ativo de aminoácidos aromáticos (transportador de aminoácidos de tipo L) e pode ser diminuída pela competição com alimentos ricos em aminoácidos (alimentos proteicos), além da quantidade de alimento no sistema digestório, pH do suco gástrico e o tempo que a substância fica exposta à degradação por enzimas da mucosa gástrica e intestinal. Acredita-se que a maior parte dos sintomas indesejáveis se devem à formação de grandes quantidades de dopamina no trato gastrintestinal. E, se ingerido em grandes quantidades pode ser potencialmente tóxico e produzir efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômitos e anorexia. Por este motivo, medicamentos que possam reduzir ou eliminar os riscos de efeitos colaterais indesejáveis são muito procurados. Via de regra, a resposta clínica do uso oral da levodopa é variável

e imprevisível, dependendo do metabolismo de cada indivíduo (JENNER, 2003; KASTURE et al., 2009; STOWE, et al., 2010).

Durante estas reações de metabolização de dopamina, espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas. E, se a dopamina não for diretamente degradada pelas células neurais e não neurais, ela pode se auto-oxidar, levando também à formação de intermediários altamente reativos, bem como espécies reativas de oxigênio (ROS). Alguns estudos relatam que o efeito benéfico da L-dopa na DP é contrabalançado por dano oxidativo a outras moléculas através de resposta direta ou indireta causado por um longo período de administração de medicamentos (TAN, 2009; ERIKSEN et al., 2010; PARK et al., 2012). Por esta razão, para que os medicamentos sintéticos a base de L-dopa sejam um tratamento eficaz para a doença, muitas vezes são ministrados junto com um inibidor de dopa-descarboxilase para aumentar a meia vida da L-dopa no sangue, visto que a enzima DDC é difusa nos tecidos do organismo convertendo de maneira intensa L-dopa em dopamina, fazendo com chegue até o SNC uma concentração de L-dopa menor do que a necessária para a conversão em dopamina. Por este motivo, a associação de inibidores de DDC aumentam a biodisponibilidade da levodopa no SNC, diminuindo a dose necessária da mesma que minimizam os efeitos secundários indesejáveis (KASTURE et al., 2009).

Alguns estudos indicam que a L-dopa derivada de *M. pruriens* tem muitas vantagens em relação à L-dopa sintética administrada aos pacientes de Parkinson, pois o fármaco sintético pode ter vários efeitos colaterais quando usada por muitos anos (THARAKAN et al., 2007). Contudo, em um estudo realizado por Cilia et al. (2017) com indivíduos com doença de Parkinson que receberam apenas L-dopa obtida de *Mucuna* e a L-dopa sintética combinada com um inibidor de dopa-descarboxilase apresentaram resultados com taxas mais baixas de discinesias nos pacientes quando administrado somente a L-dopa natural, sugerindo que o pó de MP é mais favorável do que as preparações farmacêuticas artificiais de levodopa, independentemente da presença ou ausência de DDCIs. Outro estudo de Lieu et al. (2010) também comparou os efeitos de L-dopa proveniente de *Mucuna* e L-dopa sintética. A L-dopa natural mostrou-se mais potente quando comparada com a mesma dose da artificial isolada, que se acredita ser devido a presença de um possível inibidor natural de dopa-descarboxilase presente nas sementes, fazendo com que não haja a necessidade de administrar um inibidor artificial para inibir esta enzima e prolongar os efeitos da Levodopa.

Lieu et al. (2012a) em um estudo com macacos com parkinsonismo induzido experimentalmente produziu resultados sobre a possibilidade de discinesias, onde três grupos foram tratados de maneiras diferentes. Um com levodopa sintética e carbidopa (um tipo de inibidor da enzima dopa-descarboxilase), outro com Mucuna mais carbidopa e o terceiro apenas com Mucuna. Todos os animais apresentaram melhora nos sintomas da doença. Contudo, a discinesia maior apareceu no grupo tratado com levodopa sintética, enquanto que nos pacientes tratados com a combinação de mucuna e carbidopa, a discinesia pareceu mais moderada e aqueles que receberam Mucuna, não apresentaram nenhuma discinesia. Testes semelhantes foram realizados anteriormente por Lieu et al., 2010a em roedores que receberam tratamento, onde um grupo foi tratado com levodopa artificial e inibidor de dopa-descarboxilase, outro com Mucuna mais inibidor e o terceiro apenas com Mucuna. Houve redução dos sintomas em todos os grupos, mas a melhora foi mais significativa naqueles tratados com Mucuna mais inibidor. A longo prazo, a discinesia maior apareceu em ratos que tinha tomado levodopa sintética, os tratados com Mucuna e inibidor tiveram discinesias mais brandas e os que receberam apenas Mucuna não tiveram discinesias.

Em um outro estudo recente foi investigada a eficácia e segurança do consumo de doses únicas diárias com concentrações diferentes de pó de sementes torradas de *Mucuna pruriens* obtidas sem qualquer processamento farmacológico ou compostos adicionais, solubilizadas apenas em água, em pacientes em estado avançado da doença de Parkinson. Os resultados foram positivos em relação a atividade motora, além de mostrarem que não houve diferença entre o tratamento feito com o pó das sementes de MP e a L-dopa industrializada. Sendo que os pacientes que ingeriram alta dose de Mucuna apresentaram uma resposta motora qualitativamente melhor que a preparação industrializada, além da ocorrência de menos efeitos colaterais, mostrando que a adição de um inibidor levou a um aumento nos efeitos colaterais indesejáveis do que a levodopa isolada. Sugerindo que *Mucuna pruriens* é mais favorável do que as preparações farmacêuticas de levodopa, independentemente da presença / ausência de DDCIs (CILIA et al., 2017).

Além de melhorar os sintomas da doença de Parkinson e evitar discinesias, outra vantagem da L-dopa natural proveniente de Mucuna é que a dose de ingestão necessária não aumenta gradativamente com o tempo em decorrer do avanço da doença, como é o caso daqueles que tomam drogas sintéticas. A dose de L-dopa derivada de Mucuna permanece relativamente estável durante longos períodos de tempo e as discinesias, que

eventualmente podem acontecer devido a terapia a longo prazo, ocorrem em menor severidade. Mesmo as sementes de *Mucuna* mostrando-se ser mais eficazes para o tratamento da doença de Parkinson, para obter uma dose com quantidades suficientes de L-dopa capaz de amenizar os sintomas, seria necessário prescrever grandes quantidades de sementes em pó dissolvidas em líquido. A necessidade de consumir sementes em pó várias vezes ao dia logo sobrecarregaria o paciente, dificultando o tratamento. Logo, a solução para o problema pode ser encontrada em extratos concentrados, que permitem a ingestão de doses diferentes de L-dopa de formas mais simples facilitando a gestão do consumo diário de *Mucuna* nos montantes considerados necessários. Desta forma, pode ser fornecido como comprimidos, xarope ou até mesmo diluído para injeção, por exemplo (LIEU et al., 2010b).

### **3.4 Extração com Fluido Supercrítico (EFS)**

A extração é um passo fundamental para isolar compostos bioativos naturais e diferentes técnicas foram desenvolvidas para a recuperação de compostos, mantendo suas atividades biológicas. A tecnologia envolvendo fluidos supercríticos é um processo promissor para extrair compostos de alto valor agregado a partir de matérias primas naturais, evitando a degradação térmica e a presença de resíduos de solventes tóxicos nos extratos que podem alterar as características naturais desejáveis, devido as propriedades químicas dos solventes empregados (CARVALHO JR et al., 2005; COSTA et al., 2012), o que tem conquistado o interesse da indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Esta operação unitária ocorre em duas etapas. A primeira é a extração, onde o solvente flui através das partículas e em contato com os componentes extraíveis do sólido, dissolvem-nos. E na segunda ocorre a separação da matéria-prima e do material extraído mais o solvente supercrítico que sai do extrator (BRUNNER, 1994, BRUNNER, 2005; ROSA et al., 2009).

Os fluidos aplicados neste tipo de extração encontram-se no estado supercrítico, ou seja, estão acima do ponto crítico. O ponto crítico de um fluido representa a maior temperatura e pressão em que uma substância pode coexistir em equilíbrio como vapor e líquido, e quando o fluido ultrapassa suas temperatura e pressão críticas, é considerado um fluido supercrítico apresentando propriedades físicas e químicas intermediárias entre o estado líquido e o estado gasoso (densidade e difusividade similar à do líquido e viscosidade semelhante a um gás) (SOVOVÁ et al., 2005; BRUNNER, 2005; SOVOVÁ,

2012). Nesta condição, os fluidos passam a apresentar alta difusividade, quando comparados aos solventes líquidos, que, combinados a alta densidade e baixa viscosidade, atribuem ao fluido supercrítico alto poder de solvatação, facilitando a penetrando em matrizes porosas sólidas, resultando em uma maior taxa de transferência de massa em relação aos demais solventes (BRUNNER, 2005; HERRERO et al., 2006; ROSA et al., 2009; PEREIRA et al., 2016).

Na extração com fluido supercrítico, a seletividade do processo depende de alguns parâmetros e a determinação das condições operacionais aplicadas no processo depende das características da matéria-prima e dos compostos que se desejam separar. As características da matriz sólida utilizada como matéria prima interferem diretamente no processo de extração e, por esta razão, antes da EFS, faz-se necessário a aplicação de um pré-tratamento, como moagem ou redução do tamanho da partícula e secagem, a fim de evitar o surgimento de caminhos preferenciais (por onde passa o CO<sub>2</sub>) ou entupimento da célula de extração, por exemplo, resultando, conseqüentemente, na diminuição do rendimento global de extração. O tamanho da partícula do material sólido influencia na taxa de extração de várias maneiras. O diâmetro da partícula e a superfície de contato tem relação inversamente proporcional, ou seja, à medida que o diâmetro diminui, maior a área de contato da partícula, ou seja, maior a interface sólido-líquido, aumentando a disponibilidade da matéria prima com o solvente. A redução no tamanho das partículas pode causar, também, o rompimento e a abertura das células facilitando a transferência de massa do sólido para o fluido supercrítico. Além do mais, o tamanho reduzido também diminui a distância a ser percorrida pelo soluto dentro do interior da partícula, aumentando, assim, a taxa de extração. Contudo, partículas com diâmetro muito reduzidos, diminuem a eficiência do processo, visto que podem ocasionar a compactação do leito, dificultando a circulação do solvente supercrítico em torno das partículas (BRUNNER, 1994; SOVOVÁ et al., 1994; LAROZE et al., 2010). O teor de umidade da matéria-prima também pode influenciar no rendimento do processo de extração, devido à forte interação entre água e solvente que interfere na dinâmica dos fluidos do solvente afetando a qualidade da extração e rendimento. A presença de água do material sólido pode agir como cossolvente interagindo com o solvente supercrítico e alterando a polaridade global do fluido. Por tanto, a secagem do soluto é necessária quando o percentual de água for superior considerado elevado (MEIRELES, 2008; HERRERO et al., 2013).

A temperatura e a pressão são parâmetros de processo responsáveis por fazer com que uma substância atinja seu estado supercrítico. A temperatura é a grandeza física que está relacionada com o conteúdo de energia do sistema devido o movimento aleatório de vibração das partículas ou moléculas de um determinado sistema. Quando submetidas a temperaturas elevadas, as moléculas se movimentam em alta velocidade fazendo com que as reações tendam a prosseguir mais rapidamente (ÇENGEL et al., 2006; BORGNAKKE et al., 2009; BROWN et al., 2009, PEREIRA et al., 2013). No processo de EFS, o CO<sub>2</sub> gasoso é condensado pela diminuição de temperatura, para, em seguida, ser convertido em fluido supercrítico pelo aumento de temperatura e pressão acima do seu ponto crítico (BRUNNER 2005; HERRERO et al., 2013). O aumento da temperatura ocasiona uma redução do poder de solvatação do fluido supercrítico, devido a diminuição da densidade, quando a pressão se encontra abaixo do ponto crítico. Mas também, quando está associada a pressões acima de ponto de crítico, pode melhorar a eficiência da extração (mesmo com a redução da densidade do fluido supercrítico), visto que a pressão de vapor do soluto é aumentada. A otimização deste parâmetro é importante a fim de evitar a degradação de compostos sensíveis ao calor, para alcançar a maior eficiência e rendimento de extração sem degradação de metabólitos importantes (BRUNNER, 2005; ROSA et al. 2009; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017). A extração por fluido supercrítico acontece envolvendo altas taxas de pressão, variável preferencial para ajustes, pois oferece margens de manipulação consideravelmente maiores do que a temperatura, sendo a densidade do fluido a propriedade mais afetada pelas variações de pressão, podendo conferir ao fluido supercrítico poder de solvatação aproximado ao de solventes líquidos (DE MELO et al., 2014).

O poder de dissolução de um fluido supercrítico depende da sua densidade, que é fortemente dependente das condições de temperatura e pressão, podendo ser facilmente alterada com pequenas variações desses parâmetros. A densidade dos gases, geralmente, é proporcional à pressão e inversamente proporcional à temperatura, ou seja, o aumento da pressão, à temperatura constante, causa um aumento na densidade do fluido supercrítico, aumentando o seu poder de solubilização. Ao passo que, o aumento da temperatura, à pressão constante, causa redução na densidade do fluido, reduzindo o seu poder de solubilização. Enquanto que para os líquidos e sólidos (substâncias incompressíveis) a variação de suas densidades com a pressão é desprezível (ROSA et al., 2009).

A solubilidade é um parâmetro vital no isolamento de compostos e consiste na quantidade de uma espécie química, proveniente de uma amostra vegetal, dissolvida no solvente supercrítico que passa por esse meio vegetal (BROWN et al., 2009). Os solventes no estado supercrítico possuem propriedades que aumentam significativamente o poder de solubilização de compostos e o conhecimento dessa solubilidade permite a seleção das faixas de temperatura e pressão adequadas para cada tipo de processo. A solubilidade dos fluidos em estado supercrítico é diretamente proporcional a pressão, logo, aumenta à medida que a pressão é aumentada e o poder de solvatação (ou capacidade de solubilização do solvente) é elevado devido ao aumento da densidade, por consequência (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; CARVALHO JR et al., 2005; DE MELO et al., 2014; CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

A utilização de condições operacionais a fim de aperfeiçoar o processo de extração, como temperatura e pressão, envolve alta taxa de transferência de massa, que somado ao aumento da densidade do CO<sub>2</sub> faz com que este método seja altamente seletivo na obtenção de componentes com alto valor agregado. Para relacionar as variáveis de processo (temperatura e pressão), leva-se em consideração a densidade do solvente e/ou da mistura solventes. E para a determinação destas correlações são utilizadas equações de estados a fim de determinar os melhores os parâmetros ideais para cada tipo de processamento. Tal efeito proporciona um grau de seletividade para estes fluidos, permitindo selecionar os compostos que se deseja extrair da matriz sólida (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; PEREIRA et al., 2016).

O dióxido de carbono é o fluido mais utilizado na extração supercrítica por apresentar vantagens em comparação aos demais solventes líquidos. Seu alto poder de ajuste e suas propriedades físico-químicas lhes conferem, como solvente, a capacidade de variar facilmente de gás para líquido e vice e versa. Neste sentido, as condições de temperatura e pressão selecionadas, tornam o CO<sub>2</sub> pressurizado um solvente natural para o processo de extração de compostos bioativo (CORSO et al., 2010; HUISDEN et al., 2010). Além de possuir baixa temperatura e pressão crítica (T<sub>c</sub>= 31 °C e P<sub>c</sub>= 72,9 bar), fácil manipulação, miscível em outros solventes, atóxico, não inflamável, inércia química e custo relativamente moderado, o que o torna um solvente ideal para aplicação em produtos naturais (GIL-CHÁVEZ et al., 2013; DE MELO et al., 2014). O dióxido de carbono supercrítico puro é um solvente lipofílico, considerado uma substância apolar. Logo, compostos orgânicos apolares tornam-se bem solúveis, enquanto que compostos

polares, como é o caso do composto L-dopa, tem sua solubilidade reduzida neste solvente (ROSA et al., 2009, de Melo et al., 2014).

A adição de cossolvente ou mistura de cossolventes orgânicos especialmente álcoois, são usadas para aumentar a polaridade da mistura fluida e driblar esta limitação, com o intuito de melhorar a solubilidade, alterando a polaridade e, por consequência, aumentando o rendimento de extração de compostos polares no solvente supercrítico (ELTRINGHAM et al., 2008; HERRERO et al., 2013; PEREIRA et al., 2016). Seus efeitos estão relacionados com o tipo de cossolvente, material vegetal e compostos alvo e, normalmente, eles são adicionados em uma percentagem que varia de 1% a 15% (BRUNNER, 1994; ROSA et al., 2009; DE MELO et al., 2014). Alguns autores relatam que a adição de cossolvente ao CO<sub>2</sub> supercrítico facilita a penetração do fluido na estrutura celular da amostra inchada pelo cossolvente e aumenta a densidade da fase supercrítica, causando impacto no rendimento da extração (TEMELLI e GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, 2005; CASAS et al., 2007; LEE et al., 2010, CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017).

Os cossolventes mais utilizados são etanol, isopropanol, metanol, água e misturas dessas substâncias, sendo que o etanol e a água são os cossolventes mais adequados para aplicações relacionadas à indústria de alimentos e farmacêutica, pois têm baixa toxicidade e podem ser facilmente removidos do produto final sem deixar substâncias tóxicas. O etanol é um cossolvente adequado para extração supercrítica por ter boa miscibilidade com CO<sub>2</sub> e a adição de pequenas quantidades pode aumentar expressivamente a polaridade do CO<sub>2</sub>. Quando o etanol é colocado em contato com a matriz, um processo de dissolução das substâncias polares presentes é iniciado, aumentando a cinética da extração desses compostos e tem sido empregado como cossolvente em processos de extração supercrítica com CO<sub>2</sub> para aumentar a solubilidade de polifenóis (DE MELO et al., 2014). Além do mais, dentre vários álcoois, o etanol é o mais indicado, devido ao seu baixo custo e por ser considerado seguro, pois é um solvente inócuo, tanto na saúde humana como para o meio ambiente, ideal para aplicação na EFS para fins alimentícios, cosméticos ou farmacêuticas (OSORIO-TOBÓN & MEIRELES, 2014).

De maneira geral, o sistema de extração aplicando tecnologia supercrítica, é formado por uma bomba de alta pressão, compressor, cilindro de CO<sub>2</sub>, banho de refrigeração, uma bomba de cossolvente. As amostras sólidas, previamente tratadas, são inseridas em uma célula de extração, que é então aquecida e pressurizada até atingir os

parâmetros pré-determinados, pela ação de uma bomba de alta pressão, que permite com que o fluido em estado supercrítico percorra o sistema e favoreça a separação e o arraste do composto de interesse presente na matriz sólida. Por fim, os compostos extraíveis passam por um duto e são coletados (HERRERO et al., 2006).

A pouca solubilidade de L-dopa em CO<sub>2</sub> supercrítico e a elevada seletividade do solvente faz com que a extração aplicando este tipo de tecnologia já tenha sido anteriormente sugerida para remover o óleo presente nas sementes de *Mucuna* como uma estratégia para aumentar a concentração de L-dopa na torta pós-extração, ou seja, há uma maior concentração do composto na torta pós-extração (ADEBOWALE et al., 2005; GARCIA et al., 2013). E a associação do etanol como cossolvente polar ao dióxido de carbono como solvente apolar tem o objetivo de remover o composto da matéria-prima e obter-se um extrato rico em L-dopa.

Pesquisadores têm investigado vias alternativas de síntese artificial de L-dopa para produção de medicamentos, utilizando enzimas e/ou microrganismos, mas os custos elevados, o rigoroso controle das reações e as impurezas presentes na L-dopa sintetizada por estes meios, que podem ocasionar efeitos colaterais indesejáveis nos pacientes quando ingeridos por um longo período, fazem com que seja necessário encontrar caminhos alternativos, fontes naturais desse composto, como a obtenção de L-dopa a partir de *Mucuna pruriens* (SELMA et al., 2007; THARAKAN et al., 2007; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009; KRISHNAVENI et al., 2009; SURWASE et al. 2012)

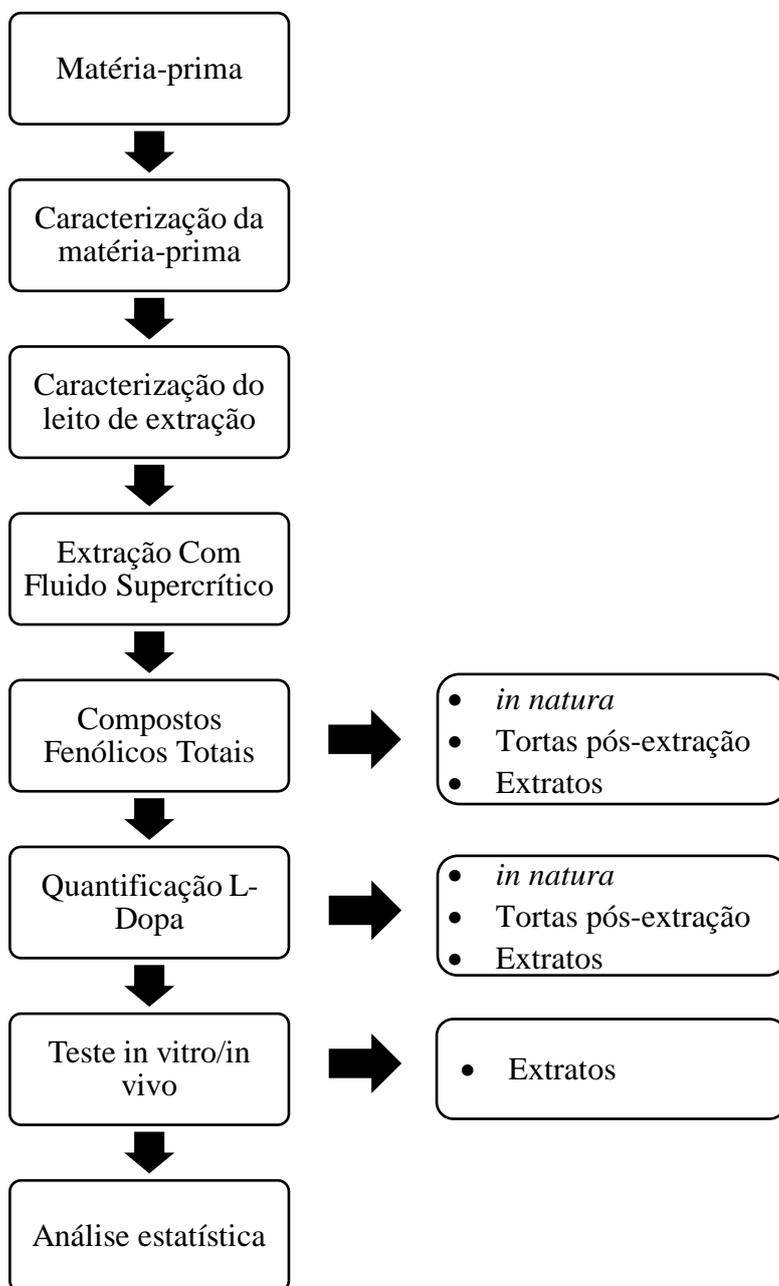
Estudos científicos relatam uso de várias técnicas para extrair levodopa de sementes de *Mucuna pruriens* para a preparação de uma composição farmacêutica bem simples, como maceração e solubilização em água, para o tratamento da doença de Parkinson registrando resultados positivos (TEIXEIRA et al., 2003; RAMYA e THAAKUR, 2007; LIEU et al., 2010b; CASSANI et al., 2016). A seleção do método de extração é muito importante para obtenção do máximo rendimento com perda mínima de bioatividade dos compostos. E dentre as vantagens da extração envolvendo solventes supercríticos destacam-se a menor ocorrência de degradação térmica dos compostos extraídos, a ausência de oxigênio e luz durante o processo de extração e de solventes agressivos nos extratos.

O uso da tecnologia aplicando fluido supercrítico no processo de extração é uma alternativa promissora para atingir elevado rendimento com boa qualidade de extrato.

Otimizar esse tipo de processo requer conhecimentos sobre a matéria-prima e, entre outras coisas, selecionar as melhores variáveis de extração (pressão, temperatura, vazão de solvente, tempo de extração etc) (MHEMDI et al., 2011; SALGIN e SALGIN, 2013).

#### 4 METODOLOGIA

Para avaliar o efeito da extração supercrítica com cossolvente sobre o teor de L-dopa do extrato de *Mucuna pruriens* testados em modelos animais da doença de Parkinson, o estudo foi realizado de acordo com o diagrama de fluxo de atividades (Figura 6).



**Figura 6:** Fluxograma metodologia

#### 4.1 Matéria-prima

As sementes de *Mucuna pruriens* foram adquiridas da empresa BRSEEDS PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE SEMENTES LTDA., localizada na cidade de Aracauba/SP, referentes a safra de 2017 e armazenadas no Laboratório de Extração na UFPA. Em seguida, foram selecionadas e moídas com a utilização de um moinho de facas.

#### 4.2 Caracterização da matéria-prima

Nas sementes de *Mucuna pruriens in natura* foram realizadas as análises físico-químicas de composição centesimal afim de determinar a proporção de cada componente em 100g de produto, seguindo os parâmetros internacionais, de acordo com os métodos da AOAC (2016).

Foram realizadas as análises de umidade por secagem em estufa a 105°C por 24h; cinzas por incineração em forno mufla a 550 °C por 4 horas; o percentual de proteína foi obtido aplicando-se o método de Kjeldhal e a metodologia de Soxhlet com solvente orgânico éter de petróleo foi utilizada para a extração e determinação de lipídeos totais. A quantidade de carboidrato foi estimada através da diferença dos valores médios obtidos.

#### 4.3 Caracterização do leito de extração

##### 4.3.1 Determinação do diâmetro da partícula

Para determinação da granulometria, o material moído foi classificado de acordo com a série padrão de peneiras Tyler com aberturas de 24 a 48 mesh (W.S. Tyler, USA), acopladas a um agitador magnético (PRODUTEST, modelo 3580, Brasil), durante 10 minutos até a separação total das partículas. Em seguida, as frações foram coletadas, pesadas e acondicionadas em sacos de polipropileno embalados à vácuo, para serem armazenadas sob refrigeração. A determinação do diâmetro médio das partículas foi feita de acordo com o método recomendado pela ASAE Standart (ASAE, 1998) por meio da equação 1:

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w} \right] \quad (1)$$

Onde:

$$\bar{d}_j = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$$

di: abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

$d_{i+1}$ : abertura nominal da peneira maior que a  $i$ -ésima peneira (mm);

$w_i$ : massa do material retida na  $i$ -ésima peneira.

#### 4.3.2 Determinação da densidade real, densidade aparente e porosidade do leito

Para o cálculo da densidade aparente ( $\rho_a$ ) utilizou-se a equação 2 através da razão entre a massa total de amostra necessária para empacotar o leito ( $m$ ) pelo volume do leito de extração ( $V$ ):

$$\rho_a = \frac{m}{V} \quad (2)$$

Onde:

$\rho_a$ : Densidade aparente

$m$ : Massa total de amostra

$V$ : Volume do leito de extração

A densidade real das partículas ( $\rho_r$ ) foi determinada por picnometria com gás hélio pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, com metodologia descrita no manual de operação do equipamento (Picnômetro automático Quantachrome, modelo Ultrapyc 1200e, USA). Esta técnica foi adotada devido a sua precisão em determinar o volume do sólido, uma vez que o gás hélio é inerte e penetra facilmente nos poros acessíveis da matriz vegetal, em virtude do pequeno tamanho dos seus átomos.

A porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) foi determinada pela relação matemática entre as densidades real e aparente, como descrito na equação (3):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3)$$

Onde:

$\varepsilon$ : Porosidade do leito

$\rho_a$ : Densidade aparente

$\rho_r$ : Densidade real

#### 4.6 Extração com fluido supercrítico

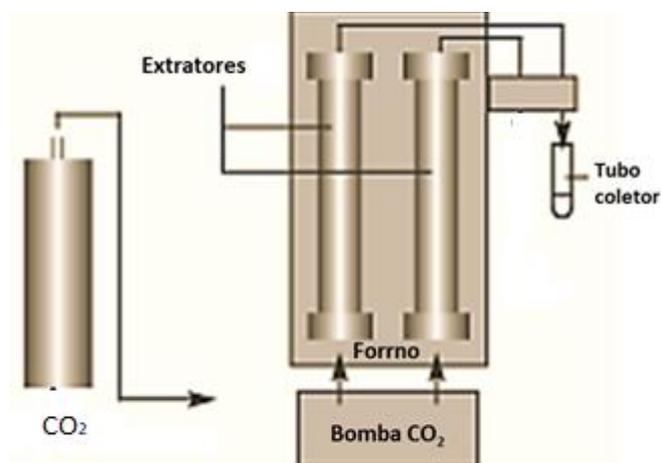
As extrações com fluido supercrítico foram realizadas no Laboratório de Extração (LABEX-FEA-UFPA) utilizando o equipamento extrator Spe-ed™ EFS (Applied

Separations, Inc., Allentown, PA USA, modelo 7071) acoplado a um recirculador (Polyscience, F08400796, USA), um compressor de volume interno de 19,7 L (Schulz, modelo CSA 7,8, Brasil), um cilindro de CO<sub>2</sub> (pureza 99,9%, White Martins, Brasil), um medidor de vazão conectado na saída do sistema (Alicat Scientific, M5SLPM, USA) e uma bomba de co-solvente, como ilustrado nas Figuras 7 e 8. O procedimento operacional de extração com CO<sub>2</sub> e co-solvente seguiu um padrão para todas as condições, seguindo as etapas contidas no manual de operações da Applied Separations (2004).

Tanto os extratos, quanto as tortas pós-extração obtidos dos processos de extração foram armazenados sob refrigeração para as análises posteriores.



**Figura 7:** Unidade de extração supercrítica (Applied Separations)



**Figura 8:** Diagrama esquemático de Spe-ed™ SFE  
**Fonte:** Applied separations (2004)

#### 4.6.1 Condições operacionais

Os ensaios da EFS foram realizados nas sementes de *Mucuna pruriens* com Dióxido de Carbono (99.9% de pureza da White Martins, Belém, Pará, Brasil) como solvente em estado supercrítico e etanol (pureza 96 %, Dinâmica, Brasil) como cos-solvente, combinados na proporção de CO<sub>2</sub> + C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (90:10 v:v).

Os parâmetros operacionais mantidos constantes foram: tempo total de extração da amostra de 210 minutos, sendo 30 min de período estático ( $t_E$ ) e 180 min de período dinâmico ( $t_D$ ); vazão de CO<sub>2</sub> de 3,0 L/min; vazão de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O de 0,6721 mL/min e massa de matéria-prima de 20g.

A temperatura e pressão foram os parâmetros operacionais variáveis (Tabela 1), sendo selecionadas de acordo com a densidade desejada afim de que o fluido supercrítico tenha capacidade de extrair os solutos (BRUNNER 1994; SOSOVÁ 2005).

**Tabela 1:** Parâmetros variáveis aplicadas nos processos de extração: Temperatura e Pressão

Condição	T (°C)	P (bar)
1	40	150
2		250
3		350
4	60	150
5		250
6		350

#### 4.6.3 Cálculo de densidade

Para as misturas solvente (CO<sub>2</sub>) e cossolvente (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), a densidade foi calculada com o auxílio do simulador Aspen Hysys (parte integrante do pacote comercial Aspen One 8.6) empregando a equação de estado Peng-Robinson (PENG E ROBINSON, 1976).

#### 4.6.4 Concentração dos Extratos

Os extratos foram submetidos a um processo de evaporação para eliminação completa do cossolvente. Para remover o etanol utilizou-se o equipamento Speed-Vac (CentriVap Centrifugal concentrators and Cold Traps), usado para concentrar amostras de pequeno volume, associando vácuo e aquecimento para evaporação de solventes com muito pouco estresse sobre a amostra, deixando-a sólida e seca. Os extratos foram submetidos a temperatura de aproximadamente 40°C por 24h. Em seguida, foram armazenados em vidro âmbar sob refrigeração.

#### 4.6.5 Cálculos dos rendimentos globais de extração

Os rendimentos globais dos processos de extração foram calculados em função da massa de extrato (sem cossolvente) pela massa de amostra em base seca (b.s.), como mostra a Equação 4.

$$X_{0 \text{ b.s.}}(\%) = \frac{m_o}{m_a \times \left(1 - \frac{U_a}{100}\right)} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$m_o$ : massa de extrato (g);

$m_a$ : massa de amostra em (g);

$U_a$ : umidade da amostra (%).

#### 4.7 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais presentes na amostra *in natura*, nas tortas pós-extração e nos extratos baseou-se no método de Folin-Ciocalteu segundo a metodologia descrita por SINGLETON et al. (1999) e GEORGÉ et al. (2005). O método baseia-se na reação dos ácidos fosfomolibdênico (H3PMO12O40) e fosfotungstístico (H3PW12O40), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, à óxido de tungstênio (W8O23) e óxido de molibdênio (MO8O23), pelos compostos fenólicos presentes no extrato, em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul.

As amostras foram preparadas pesando aproximadamente 50 mg e dissolvidas em uma solução de etanol a 70 % (v:v). Uma alíquota de cada solução foi submetida a reação com 2,5 mL de reagente de FolinCiocalteu (Tedia, Brasil) a 10 % e 2 mL de solução de carbonato de sódio (99,5 %, Vetec, Brasil) a 7,5 %. A mistura foi levada a centrifuga (Thermo Electron Led GMBH, modelo Multifuge X1R) por 10 minutos, a 10.000 rpm, a 4°C. A solução ficou sob o abrigo de luz por 60 minutos, a temperatura ambiente para ocorrer a mudança de cor, indicando que houve a reação. Em seguida, as medidas das absorvâncias foram realizadas em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60, USA) a 760 nm.

O padrão o ácido gálico (98,0%, Vetec Brasil) foi usado para a quantificação, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 40 mg/L, para construção da curva analítica. A partir da equação da reta obtida ( $y = 0,0129x + 0,0134$ ), onde  $y$  é absorvância e  $x$  é a concentração com  $R^2 = 0,9978$ , realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expressos em mg

equivalente a ácido gálico por g de material em base seca (mg AG/g). Para o branco, a alíquota de amostra foi substituída por água destilada.

#### 4.8 Quantificação de L-dopa

A determinação da concentração de L-dopa presente nas sementes *in natura*, nas tortas pós-extração e nos extratos foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA), seguindo a metodologia estabelecida por BEZERRA (2013), com modificações. Foi utilizado o cromatógrafo HPLC UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, série Ultimate 3000, EUA), equipado com bomba quaternária (LPG 3400PS), com injeção automática, detector de arranjo de diodos DAD (DAD 3000), célula de fluxo (Standart Analytical) e software de dados (Chromeleon 7.1 SR2) Thermo Finnigan Surveyor LC. A separação cromatográfica isocrática foi realizada em uma coluna de fase reversa C-18 (ACE-3-18, 3 $\mu$ m de tamanho de partícula e dimensões de 150 mm x 4,6 mm), a 30°, utilizando como fase móvel de água ultrapura, metanol e ácido fosfórico grau HPLC na proporção 97,9:2:0,1 (v/v/v), volume de injeção de 20 $\mu$ L, fluxo de 0,3 mL/min e o comprimento de onda de detecção do analito 282 nm.

Para a quantificação do teor de L-dopa das sementes *in natura* e das tortas desengorduradas, 0,1 g de amostras foram adicionadas em 5 mL de Água ultrapura Milli-Q e sonicadas por 5 min. Em seguida, a solução foi filtrada (membrana de nylon 0,45 m - Millipore) e uma alíquota de 50  $\mu$ L foi solubilizadas em 1 mL de fase móvel, novamente filtradas e injetadas.

Os extratos antes de serem injetados passaram pro processo de extração de fase sólida a fim de separar o composto L-dopa dos demais compostos que poderiam interferir na quantificação, a fim de continuar com o desenvolvimento da análise cromatográfica e permitir a identificação dos compostos alvo. A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita por Irakli et al., (2012) utilizando-se cartuchos C18 (Strata, 55  $\mu$ m, 70 A, 200 mg/ 1 mL, Phenomenex, Torrance, CA) onde foram acondicionados 1 mL de metanol e 1 mL água ultrapura acidificadas com 1 % de ácido fórmico (pureza 85 %, ISOFAR, Brasil), apara ativação do cartucho. Seguido por aproximadamente 5 mg de extrato diluído em 1 mL de metanol a 33,3 %. Depois, verteu-se sobre o cartucho 1 mL de água ultrapura acidificada e os analitos que ficaram adsorvidos no cartucho foram eluídos com metanol a 70 % acidificado. As frações foram secas e reconstituídas com fase móvel. Posteriormente as frações foram filtradas e analisadas por HPLC.

A identificação e quantificação de L-dopa nas amostras de *Mucuna* foram realizadas por comparação dos espectros em UV, tempo de retenção e co-eluição com padrão puro de L-dopa. O padrão cromatográfico de L-dopa (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, pureza  $\geq 98\%$  - Sigma-Aldrich) diluído em água ultrapura foi utilizado para preparar a curva de calibração, com injeção de soluções com concentrações crescentes de L-dopa (0,05 a 80 mg/L). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 4.9 Testes in vivo

### 4.9.1 Distribuição dos grupos experimentais

Foram utilizados no experimento 40 ratos *Rattus norvegicus*, de linhagem Wistar, machos, com 120 dias de idade, provenientes do biotério de reprodução do Instituto Evandro Chagas. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério Luiz Carlos de Lima Silveira da UEPA, em regime condições especiais.

Os 40 ratos foram separados em 5 grupos experimentais:

- Grupo Piloto (n = 3) - animais de teste para validar a técnica cirúrgica estereotáxica e testada a administração de 6-OHDA;
- Grupo Sham (n = 8) - animais que sofreram apenas o procedimento cirúrgico, sem administração de substância alguma;
- Grupo Parkinson Experimental (n = 9) - animais que receberam injeção estriatal somente de 6-OHDA (5 $\mu$ g/ $\mu$ l);
- Grupo Levodopa + Parkinson Experimental (n = 10) - animais que receberam injeção estriatal de 6-OHDA (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) e gavagem Levodopa (6mg/Kg).
- Grupo *Mucuna pruriens* + Parkinson Experimental (n = 10) - animais que receberam injeção estriatal de 6-OHDA (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) e gavagem *M. pruriens* (48mg/Kg).

Sendo que 18 animais de cada grupo experimental foram observados até o 14º dia de ensaio e 19 animais foram observados até o 20º dia de ensaio e, no dia subsequente, sofreram morte indolor.

### 4.9.2 Administração de 6-OHDA

Os animais dos grupos Parkinson, Levodopa e *Mucuna pruriens* receberam uma injeção estriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA)  $\geq 98\%$  (HPLC) (Sigma-Aldrich®), provocando a morte dos neurônios dopaminérgicos nigrais e dos terminais dopaminérgicos estriatais, de acordo com o atlas de coordenadas esterotáticas de Paxinos

e Watson (2013). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem a administração de 6-OHDA.

### **4.9.3 Testes comportamentais**

O período dos testes comportamentais foi de acordo com a progressão da morte dos neurônios dopaminérgicos (LOTHARIUS et al., 1999). Dessa forma, os animais foram submetidos aos testes comportamentais em três momentos: antes da administração de 6-OHDA (primeira avaliação comportamental), no 7º dia (segunda avaliação comportamental) e no 14º dia após a administração de 6-OHDA (terceira avaliação comportamental). Os testes comportamentais realizados foram:

#### **4.9.3.1 Teste do Campo Aberto**

Este teste foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Nahas (1999) com a finalidade de avaliar a atividade locomotora dos animais. Consiste em uma arena circular branca com 100 cm de diâmetro, formado por três círculos concêntricos e 12 raios entre o círculo mais externo e o do meio, e seis raios entre o círculo do meio e o central. Foram avaliados os parâmetros de deambulação (no número de áreas ultrapassadas pelo animal) e bipedestação “rearing” (adoção da postura bípede pelo animal a fim de explorar o ambiente).

#### **4.9.3.2 Teste da Grade Vertical**

Com a finalidade de avaliar o equilíbrio e movimentação ativa, o teste da grade vertical consiste em um equipamento de madeira de 15 x 60 x 5 cm, com uma tela de arame com malha de 0.8 x 0.8 cm, adaptado dos protocolos de Kim et al. (2010). Durante o procedimento experimental, o rato foi posicionado com a cabeça dirigida para cima, permitindo-lhe o movimento de virar e descer. Os parâmetros analisados foram: o tempo gasto para girar da posição inicial para a posição de descida; tempo gasto para descer e tempo total de teste.

#### **4.9.3.3 Teste rotacional com Apomorfina**

Este experimento de comportamento rotacional foi realizado de acordo com as metodologias descritas por Ungerstedt (1968) e Ungerstedt e Arbuthnott (1970) com modificações. A apomorfina é um agonista direto dos receptores dopaminérgicos, sua administração em animais com lesão unilateral com 6-OHDA induz rotações contralaterais à lesão. Sua ação ocorre nos receptores dopaminérgicos supersensibilizados no lado lesado (HUSTON e SCHWARTING, 1996). O animal gira para o lado que estiver

com menos receptores devido a uma assimetria nos hemisférios cerebrais, decorrente de uma regulação dos receptores dopaminérgicos no lado lesionado (WIETZIKOSKI, 2006).

18 animais foram submetidos ao teste rotacional duas semanas após a lesão estriatal com 6-OHDA, e 19 animais após três semanas. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (1mg/kg, i.p.) na direção contrária à lesão (lado contralateral), observando-se o número de rotações completas em volta do próprio eixo durante meia hora (KIM et al., 1998).

Um dia após o 7º e o 14º dia de tratamento os animais de todos os grupos serão submetidos à morte indolor.

#### **4.10 Análise estatística dos resultados**

Todos os resultados foram obtidos em triplicatas (média  $\pm$  desvio padrão) e os resultados submetidos à análise estatística, com o auxílio dos Software Bioestat 5.0 e Statistica versão 7.0 (STATSOFT INC., 2000), empregando as seguintes metodologias estatísticas: Análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância estatística, Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e Teste de Kruskal-Wallis.

### **5 RESULTADOS**

As sementes apresentaram valores médios de 10,44% de umidade em base seca e 3,19% de cinzas. As proteínas (23,29%) e os carboidratos (60,5%) representaram a maior quantidade de nutrientes das sementes desta leguminosa, ressaltando a sua importância como fontes de nutrientes vitais, além de baixo percentual lipídico (2,58%).

Adebowale et al. (2005) relatou que o conteúdo de umidade nas sementes das espécies *M. pruriens*, *M. cochinchinensis*, *M. rajada*, *M. veracruz white*, *M. veracruz mottle* e *M. deeringeana*, variou entre 3,65 e 4,64%. O teor de cinzas de 2,74 a 3,41%, o conteúdo lipídico de 8,72% a 10,19% e proteínas de 33,2% a 38,4%. Os teores de carboidratos das sementes foram altos, sendo que a espécie *Mucuna cochinchinensis* teve o maior conteúdo (49,7%), enquanto que as outras espécies variaram de 43,7 a 47,4% nas sementes inteiras. Em um outro estudo realizado por Kalidass e Mohan (2011) com sementes de *Mucuna* provenientes de cinco regiões diferentes da Índia, o teor de lipídeos variou de 6,57 a 8,80% e o conteúdo proteínas de 27,51 a 31,24%. Tavares et al. (2016) também relatou percentuais maiores de proteína (43,12%) e lipídeos (7,00%) aos encontrados neste estudo e resultados mais aproximados de umidade (8,20%) e cinzas

(3,10%). Resultados similares ao desta pesquisa foram relatados por Nwaoguie et al. (2011) que também analisaram a farinha de *Mucuna pruriens in natura* de uma região da África e encontraram 28,2% de proteínas, 2,7% lipídios e 60% de carboidratos.

Ao comparar os resultados obtidos nesta pesquisa com os relatados anteriormente, nota-se uma variação na composição centesimal, principalmente em relação ao conteúdo lipídico e proteico, que podem ser justificadas pelas diferentes variedades e condições de cultivo desta leguminosa, como características do solo, clima, temperatura, umidade e volume de chuva por se tratar de regiões diferentes, por exemplo, que podem fazer variar a concentração de cada componente. Além disso, é válido ressaltar as diferentes formas de tratamento dada as sementes, pois os processos de moagem e peneiramento a que as sementes foram submetidas podem possivelmente ter removido as cascas durante o processamento, causando alterações nestes resultados.

A densidade real ( $\rho_r$ ) e a densidade aparente ( $\rho_a$ ) das partículas apresentaram resultados iguais a 1,43 g/cm<sup>3</sup> e 0,70 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente. A relação entre as densidades real e aparente resultou no valor de porosidade do leito igual a 0,70. O diâmetro médio da partícula foi de 0,5 mm. A vazão mássica de solvente (CO<sub>2</sub>) foi de 0,531 g/min e de cossolvente (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) igual a 0,6721 g/min. Estes parâmetros são alguns que estão relacionados diretamente com a taxa de transferência de massa, exercendo forte influência sobre o rendimento (PEREIRA e MEIRELES, 2016) e estes resultados encontram-se adequados para o processo de extração com fluidos supercríticos a partir das sementes de *Mucuna pruriens*.

Neste estudo, além do dióxido de carbono, o etanol foi selecionado como cossolvente porque é um solvente reconhecido como seguro, amplamente utilizado para a extração de compostos polares, como é o caso do levodopa (OSORIO-TOBÓN e MEIRELES, 2014). O poder solvente de um fluido supercrítico e da sua mistura com cossolvente está correlacionado à sua densidade. Na Tabela 2 encontram-se os valores de densidade das misturas de CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH referente às combinações de temperatura e pressão, parâmetros que exercem um efeito considerável na extração com solventes supercríticos.

**Tabela 2:** Densidade dos solventes e rendimento de extração referentes a cada temperatura e pressão.

Condição	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Rendimento (%)
1	40	150	860,8	2,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
2		250	931,2	2,85 ± 0,05 <sup>a</sup>
3		350	975,7	3,46 ± 0,06 <sup>b</sup>
4	60	150	747,4	2,66 ± 0,03 <sup>c</sup>
5		250	850,5	3,31 ± 0,01 <sup>d</sup>
6		350	912,8	3,70 ± 0,05 <sup>e</sup>

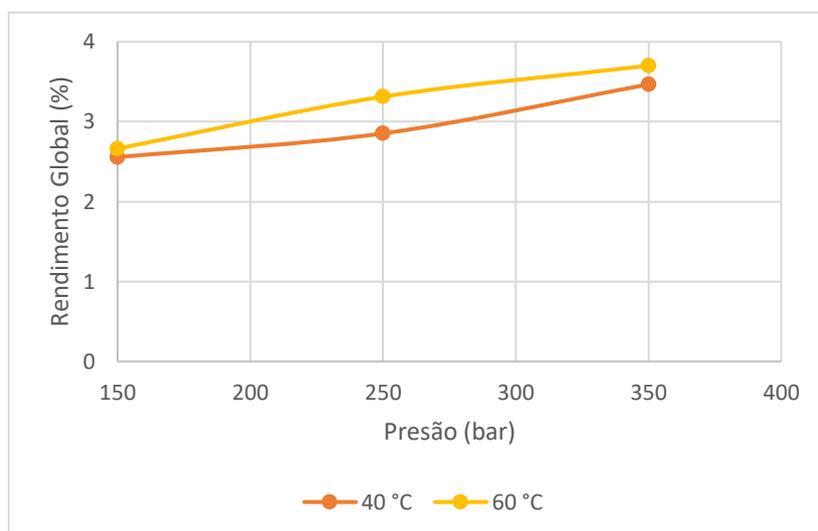
É possível observar que a variação de pressão e/ou a temperatura, promove uma variação na densidade e, conseqüentemente, da capacidade de dissolução dos fluidos. Os rendimentos globais de extração e suas respectivas condições de operação também estão resumidos na Tabela 2. A porcentagem dos rendimentos dos extratos a partir das sementes de *Mucuna pruriens* foi calculada em relação a massa de amostra de alimentação do processo. Os valores médios dos resultados obtidos apresentaram diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ ). Os rendimentos das extrações variaram de 2,55% a 3,70%, sendo que o menor rendimento foi obtido da condição 40° C, 150 bar, a uma densidade de 860,8 kg /m<sup>3</sup>, enquanto que o maior rendimento foi resultado da extração a 60°C, 350 bar e densidade de mistura de solventes de 912,8 kg / m<sup>3</sup>.

Estes resultados foram superiores aos valores encontrados por Garcia et al. (2012), que obtiveram rendimentos de até 2,90% e 2,74% usando apenas dióxido de carbono como solvente para extração de sementes das espécies *M. aterrima* e *cinerium*, respectivamente, e inferior ao rendimento de 4,56% de *Mucuna deeringiana*, rendimentos máximos obtidos de extrações a 40°C, 250 bar e densidade de 880 Kg/m<sup>3</sup>, durante 300 minutos. Tais discrepâncias de resultados podem ser justificadas pelos vários fatores que afetam o processo, como o tempo diferente de extração, que nesta pesquisa foi de 210 minutos totais e pela adição do etanol como cossolvente. Além de se tratar de espécies diferentes, cultivadas em regiões diferentes, visto que variedade de cultivares e condições ambientais também desempenham um papel significativo, pois alteram a composição química das sementes, tanto na concentração de metabólitos quanto na sua composição em diferentes substâncias químicas (FIORI et al., 2014).

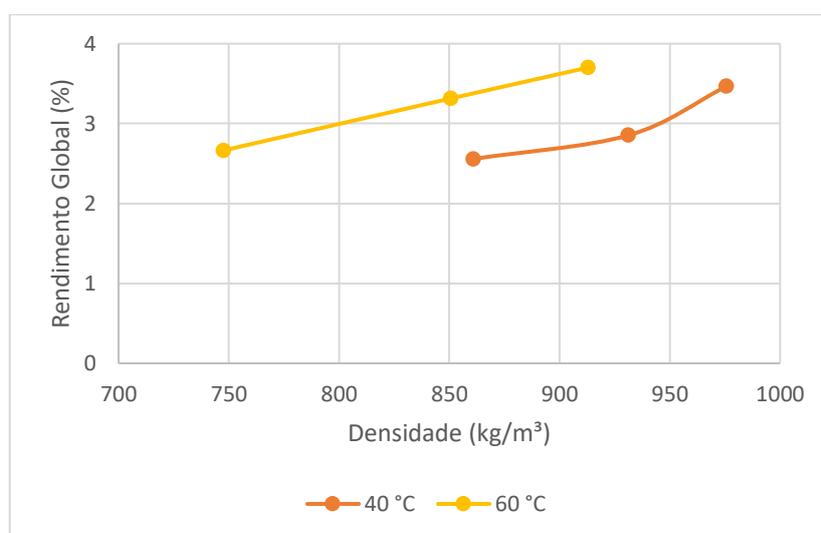
As isotermas de rendimento global de 40 °C e 60 °C são mostradas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Em todas as condições dos processos de extração observou-se que um aumento na pressão, mantendo a temperatura constante, provocou um aumento no rendimento global. Em geral, um aumento da pressão a temperatura constante provoca

um aumento na densidade do fluido supercrítico, aumentando, assim, o seu poder de solvente que facilita a penetração nos poros da matriz, promovendo o contato do solvente com os compostos que será extraído (BRUNNER, 2005, RAI et al., 2014). A variação deste parâmetro teve um efeito positivo no processo de extração, que se confirma quando os máximos rendimentos de extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico e etanol são dos experimentos com pressões mais altas, como mostra a Figura 9. Outro fator que pode ter influenciado no maior rendimento nas condições de pressões mais elevadas é o tempo de contato entre o soluto e o solvente, pois quanto maior a pressão aplicada, maior é o tempo necessário para que o sistema atinja a pressão e estabilize, e conseqüentemente, maior é o tempo de contato entre a matéria prima e os solventes, sendo maior a saturação do soluto.

Em contrapartida, a pressão constante, um aumento da temperatura leva a uma diminuição na densidade do fluido supercrítico, que induz uma menor solubilidade resultando, teoricamente, no menor rendimento da extração. Contudo, este efeito não é linear, pois a solubilidade do solvente ainda pode aumentar como resultado da pressão de vapor do soluto aumentada (onde as fases gasosa e líquida coexistem em equilíbrio). Comparando as isotermas, nota-se que nas condições de extração envolvendo a temperatura de 60°C, o efeito da pressão de vapor predomina em termos de rendimento global mássico em relação a densidade dos fluidos supercríticos, quando comparada a isoterma de 40°C nas mesmas condições de pressão (Figura 10). Além do mais, o aumento na temperatura influencia também na energia cinética das moléculas do soluto e no processo de dessorção, interferindo na solubilidade e na transferência de massa, superando o efeito da densidade sobre a taxa de extração (ROSA et al., 2009; PEREREIRA E MEIRELES, 2010).



**Figura 9:** Isotermas de rendimento mássico global versus pressão das EFS



**Figura 10:** Isotermas de rendimento mássico global versus densidade das EFS

A seleção do método de extração é muito importante para extrair o máximo rendimento com perda mínima de bioatividade dos compostos, consumo mínimo de solventes orgânicos e energia. Os resultados apontam que a temperatura, a pressão e a densidade foram variáveis importantes para a extração supercrítica, indicando que estes parâmetros afetam o processo de extração, visto que estão relacionados com o poder de solvente da mistura de solvente e cossolvente. E uma vez que o poder de solvatação e a seletividade do CO<sub>2</sub> e etanol em estado supercrítico variam consideravelmente com a densidade, torna-se possível a adequação das condições de extração de acordo com as necessidades específicas das substâncias a serem extraídas (HUANG et al., 2012).

O rendimento do extrato depende da técnica de extração aplicada, tipo de solvente e condições de operação empregadas, assim, sugere-se que os rendimentos das extrações supercríticas a partir das sementes de *Mucuna* podem teoricamente ser aumentados variando a pressão, temperatura, a concentração de solvente e cossolvente que, conseqüentemente, variam os valores de densidade da mistura de solventes supercríticos. Além de tempo total de extração que deve ser suficiente para garantir a interação entre as partículas da matéria-prima e o/os solvente(s) para resultar na máxima solvatação; diâmetro médio das partículas sólidas, modificando a área de contato disponível para transferência de massa; variando a vazão do solvente e cossolvente, fornecendo maior número de moléculas de solvente em contato com as moléculas de soluto, intensificando a interação e dissolução do soluto (DUBA e FIORI, 2015).

A análise dos compostos fenólicos totais fornece uma estimativa do conteúdo de todos os compostos que pertencem às subclasses de fenólicos presente na amostra *in natura*, nas tortas pós-extração e nos extratos de *Mucuna pruriens* e mostra-se de grande importância, uma vez que o L-dopa, principal composto relacionado com a propriedade medicinal desta semente para o tratamento de DP, é classificado como composto fenólico. Além do que, são metabolitos com diversas atividades terapêuticas fortes que atuam de diversas maneiras podendo impedir o avanço e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (URSZULA et al., 2015). Além do mais, a medição destes metabolitos pode fornecer informações importantes sobre a qualidade dos métodos de extração e dos solventes aplicados. Na Tabela 3 encontram-se os valores referentes ao teor de compostos fenólicos totais obtidos para as tortas pós-extração e dos extratos de *Mucuna* obtidos via EFS. Estatisticamente, em relação ao conteúdo total de compostos fenólicos das tortas e dos extratos observou-se diferença significativa entre as condições de extração.

**Tabela 3:** Compostos fenólicos totais das tortas pós-extração e dos extratos e atividade antioxidante dos extratos das sementes de *Mucuna pruriens* obtidos das extrações supercríticas.

Condição	Compostos fenólicos totais torta pós-extração (mg AG/g)	Compostos fenólicos totais extrato (mg AG/g)
1	56,99 ± 0,10 <sup>a</sup>	55,58 ± 0,80 <sup>a</sup>
2	54,09 ± 0,08 <sup>b</sup>	64,47 ± 0,04 <sup>a</sup>
3	55,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	80,24 ± 0,30 <sup>ab</sup>
4	62,50 ± 0,06 <sup>a</sup>	58,24 ± 0,04 <sup>a</sup>
5	54,84 ± 0,04 <sup>a</sup>	59,75 ± 0,90 <sup>bc</sup>
6	59,53 ± 0,08 <sup>ab</sup>	82,25 ± 0,12 <sup>c</sup>

O total de compostos fenólicos presentes na amostra *in natura* foi de 45,20 mg AG/g. A torta com menor quantidade de compostos fenólicos foi a resultante da extração de 40°C e 250 bar (54,09 mg AG/g) e o maior resultado foi encontrado na torta de 60°C e 150 bar (62,50 mg AG/g). Observou-se que a extração causou um aumento significativo na concentração de fenólicos totais nas tortas pós-extração em relação as sementes *in natura*, evidenciando a vantagem do uso da extração supercrítica para a concentração desses compostos devido a remoção de substâncias apolares, por exemplo. O mesmo efeito também foi observado anteriormente por Garcia et al. (2015) nas sementes de *Mucuna aterrima*, *cinerium* e *deeringiana in natura* que apresentaram valores de 43, 55 e 43 mg AG/g de compostos fenólicos totais nas amostras *in natura* e, nas melhores condições operacionais de extração via supercrítico aplicando somente CO<sub>2</sub>, as tortas pós-extração tiveram um acréscimo de 54, 65 e 54 mg AG/g, respectivamente, nas condições de maiores rendimentos.

O extrato com menor teor de compostos fenólicos (55,58 mg AG/g) foi obtido com 40° C a 150 bar, enquanto que a melhor condição de operação de extração em termos de conteúdo fenólico foi 60° C a 350 bar (82,25 mg AG/g). Aware et al. (2017) avaliou o conteúdo de fenólicos totais de extratos obtidos por imersão com diferentes solventes de extração (água, metanol, etanol e acetona) a partir da espécie *Mucuna macrocarpa* sem a casca. Os resultados mostraram que o extrato aquoso apresentou maior teor de fenólicos 103, 03 mg GAE / g, enquanto o menor conteúdo foi obtido com extrato a base de acetona com 14,84 mg GAE / g. Os extratos aquoso e metanólico mostram ter maior capacidade de extração de fenólicos, em relação aos extratos etanólico e acetônico, que pode ser explicado pela diferença de polaridade. A água é mais fortemente polar do que a acetona, evidenciando que a polaridade do solvente é importante fator para a extração seletiva de

compostos bioativos de uma determinada natureza. Em relação ao teor de compostos fenólicos totais dos extratos com etanol (66,96 mg GA/g), mesmo solvente aplicado nesta pesquisa, comparando os resultados, observa-se que os teores de fenólicos dos extratos obtidos via extração supercrítica foram superiores em praticamente todas as condições de pressão, temperatura e densidade, comprovando a eficiência da extração supercrítica na extração destes compostos.

Os resultados no conteúdo de compostos fenólicos totais presentes nas tortas pós-extração e nos extratos demonstram que o processo de extração supercrítica causou alterações nesta propriedade. Os menores teores de compostos fenólicos das tortas, bem como os maiores conteúdos dos extratos foram obtidos nas condições experimentais de maior rendimento mássico. Da mesma forma como os maiores teores de fenólicos das tortas e os menores conteúdos nos extratos foram encontrados na condição que resultou no menor rendimento de extrato. Estes dados reforçam como as condições de operação do processo e o uso de etanol como cossolvente influenciaram de maneira benéfica na seletividade e conseqüentemente na obtenção de extratos com compostos desejáveis a partir das sementes de *Mucuna*. A adição de cossolvente polar, aumentou a solubilização de compostos de maior polaridade (polares), contribuindo para o aumento da solubilidade dos compostos fenólicos, capaz de arrastá-los da matéria prima para o extrato. Logo, verificou-se que a adição de etanol devido ao aumento das interações moleculares do solvente supercrítico com as substâncias em questão, aumentou o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos (HERRERO et al., 2013, DE MELO et al., 2014).

A extração de compostos fenólicos a partir de uma matriz vegetal é influenciada por vários fatores, como a natureza química, condições de cultivo e armazenamento da matéria-prima, do método de extração aplicado, do tamanho das partículas, tempo de extração, da presença de substâncias interferentes, entre outros. A sua solubilidade depende fortemente da natureza do solvente usado (polaridade) e da sua interação com os demais componentes da matriz. Sendo os compostos fenólicos moléculas consideradas instáveis, de fácil oxidação e degradação, a extração supercrítica mostrou-se uma boa alternativa para obtenção de extratos com elevados teores de compostos fenólicos. Além de serem obtidos com temperaturas relativamente brandas, garantindo sua maior estabilidade (SANTOS et al., 2014; NIPORNRAM ET AL., 2018).

O conteúdo de L-dopa foi determinado usando sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que fornece uma estimativa do conteúdo presente na amostra

*in natura*, nas tortas pós-extração e nos extratos obtidos via extração supercrítica com dióxido de carbono e etanol das sementes de *Mucuna pruriens*. A avaliação qualitativa e quantitativa confirmou o conteúdo de L-dopa em todas as amostras, como indicado na Tabela 4. A concentração de levodopa foi quantificada com base na área de pico dos cromatogramas e no tempo de retenção, usados para os cálculos. Componentes não-levodopa também foram identificados, ainda que não tenham sido examinados neste estudo. O tempo de retenção da L-dopa padrão é de aproximadamente 3,5 minutos. Os cromatogramas das amostras das sementes *in natura*, das tortas e dos extratos estão no Anexo I.

**Tabela 4:** Concentração de L-dopa nas tortas pós-extração e nos extratos supercríticos de *Mucuna pruriens*.

Condição	L-dopa Torta pós-extração (mg/g)	L-dopa Extrato (mg/g)
1	30,06 ± 0,3 <sup>a</sup>	*
2	29,57 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>
3	27,33 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,03 <sup>a</sup>
4	37,99 ± 0,09 <sup>b</sup>	*
5	32,61 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,27 <sup>a</sup>
6	29,79 ± 1,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>a</sup>

\*Não quantificável.

Antes da análise no HPLC, os extratos passaram por um processo de extração em fase sólida, um procedimento preliminar utilizado para limpeza, extração, fracionamento e/ou pré-concentração para análise de compostos presentes em uma matriz vegetal, capaz de extrair ou separar uma ampla gama de analitos orgânicos (polares e apolares) de amostras biológicas. Uma das principais vantagens desta técnica é que os analitos sorvidos no cartucho podem ser impedidos de se decompor, sem qualquer alteração em sua concentração ou identidade (ZHOU, MASKAOUI E LUFADJEU, 2012). Nesta pesquisa este método foi aplicado como uma maneira simples de promover uma limpeza ou purificação no extrato de *Mucuna*, através da separação de compostos interferentes que dificultavam a identificação do composto L-dopa. Contudo, houve certa irregularidade com a retenção e eluição do composto levodopa no processo de extração. Uma quantidade pequena do composto foi eluída na fração recolhida da amostra e a maior parte foi eluída na fração seguinte de água acidificada com 1% de ácido fórmico e metanol 70% acidificado com 1% de ácido fórmico (onde os compostos deveriam sair em sua totalidade). Várias outras metodologias de extração em fase sólida foram avaliadas na

tentativa de otimizar o protocolo, mas nenhuma proporcionou resultados mais satisfatórios. Portanto, para a quantificação, as frações recolhidas de amostra e de água e metanol foram analisadas no HPLC e seus resultados foram somados para a quantificação total do composto L-dopa nos extratos de *Mucuna* obtidos da extração com fluido supercrítico.

A análise confirmou a presença de L-dopa nas sementes *in natura* de *Mucuna* (21,78 mg/g) e a extração supercrítica aumentou o conteúdo desse composto bioativo nas tortas pós-extração, devido a extração de outros compostos que aumentou a sua concentração, como indicado na Tabela 4. As tortas pós-extração apresentaram diferença significativa em relação ao teor de levodopa. A torta resultante da condição de 40°C e 250 bar foi a que apresentou menor teor de L-dopa com 29,57 mg/g e os maiores teores de L-dopa foram detectados na condição de 60°C e 150bar, com 37, 99%. A alta concentração do composto L-dopa nas tortas pós-extração supercrítica, principalmente nas condições de maior rendimento mássico, confirmam o efeito positivo da extração na concentração de L--dopa nas tortas. Conclusão anteriormente comprovada por Garcia et al. (2012) que aplicou a extração supercrítica apenas com dióxido de carbono com o intuito de aumentar a concentração de L-dopa na torta pós extração de *Mucuna*, devido à baixa solubilidade da L-dopa no CO<sub>2</sub> supercrítico. Objetivo contrário ao desta pesquisa que buscou retirar o composto da torta para o extrato pela ação do cossolvente polar (etanol).

Aware et al. (2019) quantificou L-dopa em sementes *in natura* e processadas de *Mucuna* e constatou um comportamento diferente. Os processamentos aplicados nas sementes (autoclave, fervura, imersão em água e torrefação) reduziram o conteúdo do composto em relação as sementes *in natura*, possivelmente em consequência das temperaturas elevadas aplicadas nos processos. As sementes *in natura* tiveram resultado igual a 115 mg/g. O processo de fervura foi o que resultou no menor resultado (52,4 mg/g) e torrefação o com melhor resultado (88,8 mg/g). Em uma pesquisa anterior realizada pelo mesmo autor, a análise qualitativa e quantitativa de L-dopa em sementes de *M. macrocarpa* moídas e solubilizadas em água acidificada com ácido clorídrico e sonicadas também confirmou o alto teor de L-dopa (115,410 mg/g), relatado como a espécie com teor mais alto entre as espécies *Mucuna* (AWARE et al., 2017). Concentrações superiores de L-dopa em sementes de *M. pruriens* também já foram estimados por HPLC relatadas por Cassani et al. (2016) que testou sementes de *Mucuna* da África secas, cozidas e

assadas foram preparados por extração com ultrassom com água acidificada com ácido clorídrico. A concentração mediana de Levodopa nas sementes secas foi de 52,9 mg/g, não foi encontrada levodopa nas sementes cozidas e a concentração de Levodopa no pó de sementes torradas foi de 53mg/g. Outras espécies e variedades de *Mucuna*, como a *M. pruriens* var. *utilis* e *Mucuna sanjappae* já foram relatadas com valores mais baixos, 12,5-91,6 mg / g e 73 mg / g respectivamente, também solubilizadas apenas em água acidificada e sonicadas (INGLE, 2003; PATIL et al., 2015).

As condições de operação de 40 e 60°C a 150 bar tiveram um efeito mínimo sobre o nível levodopa e não foi possível quantificar o composto nos extratos obtidos com estes parâmetros. Apesar de os picos não aparecerem de forma isolada e bem definida, como nas tortas pós-extração, através dos espectros DAD-UV e por comparação com padrões pode-se confirmar que se trata do composto L-dopa. A concentração de L-dopa não diferiu significativamente entre os extratos. O conteúdo médio variou de 0,39 a 0,43 mg/g. O extrato da condição 60°C e 250 bar mostrou uma concentração relativamente mais baixa em comparação com os demais (0,39 mg/g), enquanto que a extração de L-dopa foi melhor pela condição 40°C e 350 bar, ou seja, apresentou melhor eficiência em termos de extração desse composto, compatível com um dos resultados de maior rendimento. Johnson et al. (2018) avaliou os extratos de sementes de *M. pruriens* produzidos com solventes diferentes quanto ao conteúdo de L-dopa. Os níveis de L-dopa no extrato metanólico foi de 280mg/g, água igual a 231,9mg/g, butanol equivalente a 100mg/g e reduziu significativamente para 0,3mg/g e 5,4 em acetato de etila e hexano, respectivamente. Contudo, testes biológicos realizados com o extrato de acetato de etila, comprovaram que até mesmo esse baixo nível (0,03%) de L-dopa mostra efeitos neuroprotetores contra Parkinson.

A variabilidade entre as substâncias e suas concentrações é esperada quando se trata de produtos naturais, o que foi observado em relação a quantidade de levodopa em todas as amostras de *Mucuna pruriens*. Outra possível razão para a variação do gradiente de L-dopa pode ser por efeito do transporte de L-dopa das demais partes da planta para as sementes, pela conversão natural em dopamina que pode acontecer ainda na planta (por atividade catalítica de DDC), pela auto-oxidação do composto, da maturidade das sementes e das características físico-químicas que dependem de vários fatores ambientais (condições climáticas, luz solar, umidade etc), tempo e práticas de colheita, região geográfica onde as espécies foram germinadas. Além do mais pode haver degradação de

L-dopa durante todo o processo até a obtenção dos extratos que pode explicar valores mais baixos (MATSUMOTO 2011; MUSHTAQ et al. 2013; PULIKKALPURA et al., 2015).

Pode-se sugerir também, que os menores resultados de concentração do composto nas diferentes amostras em comparação aos demais estudos podem ser justificados pelo processo prévio extração em fase sólida para purificação pelo qual os extratos foram submetidos, que podem não ter sido eficiente na separação das substâncias, dificultando a detecção e quantificação do composto L-dopa. A técnica de obtenção dos extratos também pode ter citada como uma justificativa. O composto L-dopa tem baixa solubilidade no CO<sub>2</sub> supercrítico e a concentração de etanol e as condições de operação pode não ter sido suficiente a ponto de melhorar a polaridade e assim aumentar o rendimento de extração L-dopa, o que faz com o composto fique concentrada na torta pós-extração. Contudo, pressupõe-se que a levodopa presente nas sementes de *Mucuna* pode ser extraída por fluidos supercríticos desde que o empacotamento do leito de extração, a concentração dos solventes, a temperatura, pressão e o tempo da extração sejam suficientes e adequados. E apesar dos resultados inferiores, a extração supercrítica apresenta vantagens em relação as demais técnicas por ser uma tecnologia segura e ecologicamente correta, como o uso de pouco ou nenhum solvente orgânico, aplicação de baixas temperaturas, entre outros que favorecem a atividade biológica dos extratos. E a seleção do método de extração mais adequada é muito importante para extrair a maximização do rendimento com perda mínima de bioatividade e consumo mínimo de solventes orgânicos, bem como energia.

Levodopa é uma molécula importante utilizada para a síntese do neurotransmissor dopamina e atua como uma droga principal para o tratamento sintomático da doença de Parkinson e a identificação e quantificação de níveis consideráveis de L-dopa em extratos de *M. pruriens* é muito significativo. Apesar do baixo conteúdo de levodopa, os extratos podem conter outros benefícios devido à presença de outros compostos que podem auxiliar no tratamento com efeitos secundários ou que potencializam o efeito da L-dopa reduzindo os sintomas da doença. Além do mais, estudos descritos anteriormente demonstraram vantagens da L-dopa natural obtida de *Mucuna pruriens* em relação a L-dopa sintética, como discinesias menos evidente, além de outros possíveis efeitos neuroprotetores (LIEU et al., 2010; YADAV et al., 2013; YADAV et al., 2014).

Análise de quantificação de Levodopa é um passo importante na seleção do melhor extrato supercrítico de *Mucuna* para o uso em estudos in vivo que podem ser usados em aplicações farmacêuticas para o tratamento de doença de Parkinson (ou como auxiliar no tratamento). Cassani et al. (2016) sugere que estudos de quantificação prévia de L-dopa são importantes para determinar a dose terapêutica necessária para tratar pacientes com doença de Parkinson levando em consideração as características do ecótipo das sementes utilizadas para evitar efeitos colaterais indesejáveis.

Simulando as desabilidades motoras promovidas pela redução de dopamina estriatal presentes na doença de Parkinson (RICHARDSON e HOSSAIN, 2013), a injeção estriatal de 6-OHDA em camundongos promoveu o comprometimento motor significativo, especialmente com alteração da estabilidade/equilíbrio, com desempenho nos testes de grade vertical e campo aberto estatisticamente prejudicados após o procedimento estereotáxico, confirmando achados de outros estudos com esse modelo experimental (RIZELIO et al, 2010). Para os testes, foram utilizadas para o tratamento misturas dos extratos obtidos das condições de 40°C a 350 bar e 60°C a 350 bar, devido suas características semelhantes, principalmente em relação ao rendimento mássico e concentração do composto L-dopa.

A utilização do teste comportamental do campo aberto permite avaliar o comportamento motor dos animais, por meio da atividade exploratória, quantificada pelo número de travessias e da realização de bipedestações, com e sem apoio, avaliando, também, o equilíbrio, ambas, presumivelmente diminuídas no contexto da doença (SANTIAGO et al, 2010; CARVALHO et al, 2013). O teste comportamental da grade vertical revela as funções de força neuromuscular e coordenação motora, demonstrando a acinesia/bradicinesia da doença de Parkinson, em face de um atraso no início do movimento e redução da velocidade do mesmo (ALLBUTT e HENDERSON, 2007; KIM et al, 2010). E, é esperado, que os tratamentos com extrato de *Mucuna* obtido por fluido supercrítico e com levodopa sintética, promovam melhoria nesses resultados.

Para avaliar a eficiência do modelo de indução por injeção de 6-OHDA, foi realizada comparação conjunta de todos grupos amostrais entre a primeira análise comportamental (um dia antes do procedimento cirúrgico estereotáxico) e a segunda análise comportamental (no 7º dia após o procedimento, antes do início do tratamento). Entre os testes realizados, a indução de doença de Parkinson pode ser comprovada por meio de diferenças significantes entre o Teste de Campo Aberto, pela redução do número

travessias, de bipedestações com apoio e sem apoio e no Teste de Grade Vertical, com aumento do tempo para virar até a posição de descida e do tempo total de realização do teste. Após a administração dos tratamentos com Levodopa e *Mucuna pruriens*, realizou-se a terceira análise comportamental. Não foi observado qualquer diferença nos parâmetros comportamentais entre os grupos tratados por 7 ou 14 dias, portanto, nos testes estatísticos para comparação dos tratamentos, essas amostras foram agrupadas.

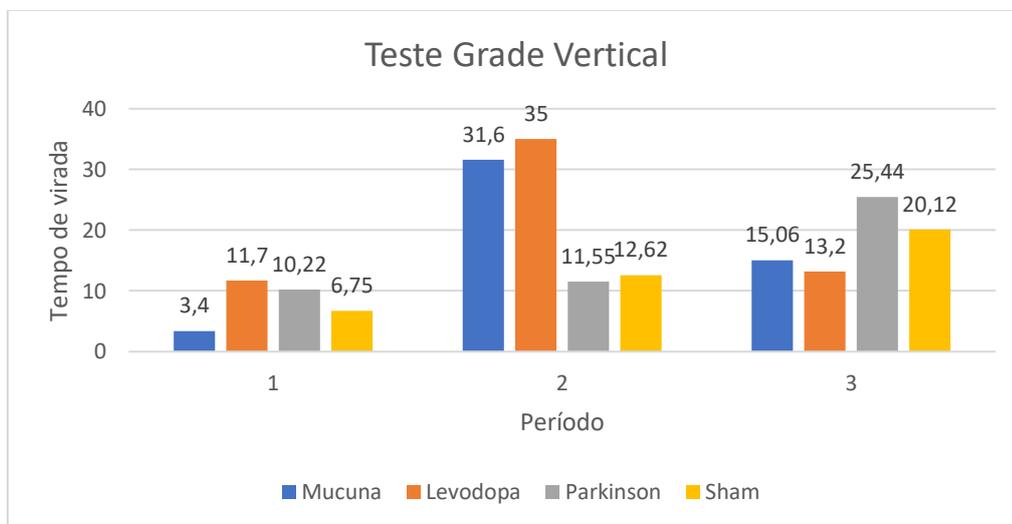
Os resultados foram positivos em relação a atividade motora em quase todos os testes em todos os animais tratados tanto com extrato de *Mucuna*, como com Levodopa sintética, ou seja, todos apresentaram melhora nos sintomas da doença. Exceto em relação ao número de rotações induzidas pela apomorfina, que não surtiram efeito, como mostra a Tabela 5. Contudo, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos. Os resultados foram melhores naqueles que ingeriram doses L-dopa artificial, com melhora mais rápida nos sintomas. Ao comparar o desempenho entre os testes comportamentais antes e depois do tratamento, a administração de Levodopa demonstrou impacto significativo no Teste de Campo Aberto, evitando decaimento do número de travessias, e no Teste da Grade Vertical, reduzindo o tempo total do teste. Resultados semelhantes foram anteriormente demonstrados por Kasture et al (2009), com a mesma dose (6mg/kg, I.P), que promoveu diminuição significativa do tempo total gasto para realização do teste da grade vertical e aumento do número de travessias no teste do campo aberto, ressaltando sua ação sobre a deambulação e acinesia. A resposta ao tratamento com extrato de *Mucuna* também foi avaliada e apresentou resultados positivos. Contudo, os extratos foram associados a um inibidor de descarboxilase, na tentativa aumentar a disponibilidade do composto L-dopa que atravessa a barreira hematoencefálica e é convertida em dopamina.

**Tabela 5:** Resultados testes de Campo aberto e de Grade vertical realizados em modelos animais de Doença de Parkinson.

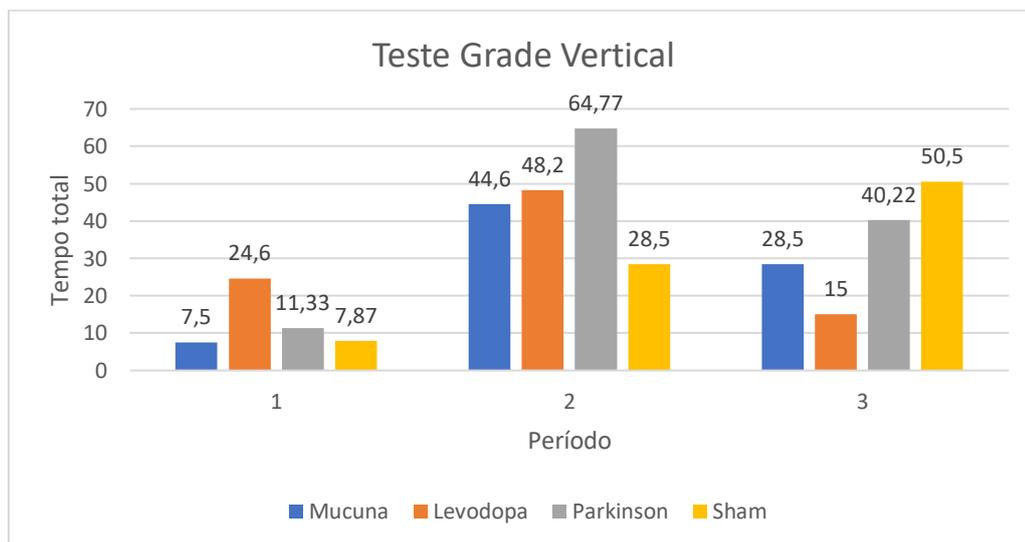
<b>TESTES</b>	<b>MUCUNA</b>	<b>LEVODOPA</b>	<b>PARKINSON</b>	<b>SHAM</b>
<b>TESTE 1</b>				
<b>TRAVE</b>	47,72	48	43,88	26,81
<b>BCA</b>	25,19	22,5	25,61	14,12
<b>BSA</b>	9,02	7,75	5,66	8,81
<b>LIMPE</b>	1,6	2,4	1,72	1,12
<b>DEF</b>	5,59	1,9	1,61	1,75
<b>TVIRADA</b>	3,4	11,7	10,22	6,75
<b>TDESCIDA</b>	4,1	0,9	1,1	1
<b>TTOTAL</b>	7,5	24,6	11,33	7,87
<b>TESTE2</b>				
<b>TRAVE</b>	35,4	46,05	44,83	22
<b>BCA</b>	11,1	10,25	11,66	8,5
<b>BSA</b>	0,5	0,6	2,77	1,43
<b>LIMPE</b>	1,7	1,15	1,83	1
<b>DEF</b>	2,4	2,4	1,83	1,56
<b>TVIRADA</b>	31,6	35	11,55	12,62
<b>TDESCIDA</b>	1	1,2	0,55	0,87
<b>TTOTAL</b>	44,6	48,2	64,77	28,5
<b>TESTE3</b>				
<b>TRAVE</b>	27,95	25,05	29,16	16,62
<b>BCA</b>	8,4	8,5	10,16	6,06
<b>BSA</b>	0,6	1,45	2,61	0,75
<b>LIMPE</b>	0,65	1	0,11	0,87
<b>DEF</b>	1,75	2,6	2	2,18
<b>TVIRADA</b>	15,6	13,2	25,44	20,12
<b>TDESCIDA</b>	0,9	1,8	1,44	0,75
<b>TTOTAL</b>	28,5	15	40,22	50,5
<b>APOIPSI</b>	4,2	3,8	15,55	7
<b>APOCONTRA</b>	7,5	7,1	7,66	12,5

Nesta pesquisa, apesar de estatisticamente a administração de Mucuna não demonstrar melhora nas alterações parkinsonianas desenvolvidas pela injeção estriatal de 6-OHDA em relação ao impacto no desempenho motor, a análise visual empírica e os resultados isolados de cada teste, demonstraram algum grau de melhora, sinalizando que o tratamento feito com baixa dose de MP (48mg/kg, V.O) foi satisfatório, apresentando alguns resultados aproximados aos resultados obtidos com L-dopa artificial, promovendo algum efeito positivo no comportamento dos animais tratados com Mucuna em relação aos animais com Parkinson não tratados e frente aos testes intragrupo antes e depois do tratamento, avaliados pelos testes comportamentais. Nos testes de grade vertical, houve redução nos tempos de virada e total do teste nos animais tratados com Mucuna do

segundo para o terceiro período, indicando um efeito positivo nos sintomas da doença, como mostram as Figuras 11 e 12.



**Figura 11:** Teste de grade vertical – tempo de virada



**Figura 12:** Teste de grade vertical – tempo total de teste

Estudos preliminares realizados em animais e em humanos com doença de Parkinson já comprovaram que extratos de MP podem ser usados para melhorar os sintomas da doença com baixos ou nenhuns efeitos colaterais. O tratamento com *Mucuna pruriens* eleva a concentração de dopamina no cérebro de animais, exibindo efeitos antiparkinsonianos semelhantes ou superiores aos obtidos com a administração de levodopa sintética, devido a concentrações elevadas de L-dopa que é convertida em

dopamina no sistema nervoso central, na tentativa de reestabelecer a transmissão dopaminérgica (LIEU et al. 2010; LIEU et al., 2012). Cilia et al. (2018), em um estudo recente, investigou 14 pacientes com DP com sintomas de variações motoras e discinesias que receberam *Mucuna* em pó obtido de sementes torradas e levodopa comercializada, média de 18,7 mg / kg / dia, em ordem aleatória durante 16 semanas. Medidas de eficácia foram notadas na qualidade de vida, motora e não motora. Contudo alguns pacientes apresentaram intolerância ao alto consumo das doses de *Mucuna*, desenvolvendo efeitos colaterais gastrointestinais e passaram a receber doses em menor concentração. Mas os pacientes que conseguiram tolerar MP, a resposta clínica foi semelhante aos tratados com L-dopa sintética. Johnson et al. (2018) ainda estudou o efeito protetor dos extratos de *Mucuna pruriens* com diferentes solventes contra a toxicidade induzida por células durante os processos de oxidação que se desencadeiam durante a doença de Parkinson. E os resultados mostraram que entre os extratos, o de menor concentração de L-dopa (0,03%) aumentou significativamente a resposta das células ao estresse oxidativo e a neuroinflamação. Confirmando que, embora muitos estudos confirmem a melhora nos sintomas da doença aos altos níveis de L-dopa nos extratos de *Mucuna*, evidências emergentes sugerem que outros compostos presentes no extrato, além de L-dopa, também podem ter efeitos neuroprotetores. Por exemplo, Poddighe et al., (2014) observou efeitos anti doença de Parkinson, incluindo melhorias da função motora, do extrato metanólico de *Mucuna* contendo baixos níveis de L-dopa (0,1%).

Vale ressaltar que em modelos experimentais, a dose, forma de apresentação e método de administração do tratamento com *Mucuna pruriens* ainda não está bem estabelecido. A utilização de doses semelhantes às aplicadas nesse estudo se mostraram benéficas em pesquisas prévias (KASTURE, 2009), entretanto, a administração foi realizada intraperitonealmente, ou seja, aplicada diretamente no interior do peritônio. Assim, é possível prever que a administração via oral de *Mucuna pruriens* sofreu efeito de primeira passagem, sendo metabolizado pelo fígado, visto que a mucosa gastrointestinal é um local para a descarboxilação da L-dopa, e excretado em parte pelos rins e, dessa forma, o princípio ativo restante não foi suficiente para atravessar a barreira hematoencefálica gerar resultados semelhantes ao controle L-dopa. Além do mais, utilizando-se *Mucuna pruriens* oral, somente administrações prolongadas se mostraram efetivas em outros modelos experimentais de Parkinson e iniciadas antes da indução da doença, admitindo-se um fator neuroprotetor concomitante, ou seja, períodos de

tratamentos mais longos são necessários para alcançar uma resposta sustentável ao uso de MP para o tratamento da doença (YADAV et al, 2013, CILIA et al., 2018).

O modo de preparo das formulações a base de *Mucuna pruriens* também é um fator importante para determinar a dose para potencializar os benefícios e minimizar os efeitos colaterais a longo prazo. E, nesta pesquisa, a obtenção do extrato de *Mucuna* administrado pode ter influenciado os resultados comportamentais, uma vez que, a técnica de extração com dióxido de carbono supercrítico, apesar de suas vantagens, pode ter resultado em um extrato com concentração de L-dopa abaixo do necessário para agir de maneira mais significativa nas análises comportamentais. Ainda assim, estes resultados evidenciam que o tratamento feito com baixa dose de MP apresentou resultados aproximados aos resultados obtidos com L-dopa artificial, levando em consideração que a concentração de L-dopa nos extratos é bem inferior a concentração presente no medicamento usado para o tratamento nesta pesquisa. E os efeitos positivos sobre os parâmetros avaliados, mesmo que não significantes a nível de estatística, sinalizam algumas possíveis vantagens, como a necessidade de consumir menor quantidade do extrato de *Mucuna* e de substâncias artificiais para o tratamento da doença, reduzindo os possíveis efeitos colaterais ocasionados pelo alto teor de compostos antinutricionais e pelo consumo elevado de medicamentos. E a aplicação da técnica de extração com fluido supercrítico para extração do composto L-dopa mostrou-se adequada, facilitando a maneira de ser aplicado para o tratamento de Doença de Parkinson.

Além de tudo, o extrato de *Mucuna* contém uma pequena quantidade de levodopa que, isoladamente, não justifica a melhora clínica dos sintomas parkinsonianos. Isto tem duas explicações possíveis: que a levodopa natural é mais potente ou que *Mucuna* contém outros produtos químicos benéficos que potencializam os efeitos da levodopa aumentando a sua eficiência metabólica, que facilitam a sua absorção pelo organismo ou que também tenham ação antiparkinsoniano. Resultados observados anteriormente em pacientes humanos e em animais mostraram que, além da levodopa natural, *Mucuna pruriens* pode conter outros compostos com atividade sobre a doença de Parkinson. A presença de outros fitoquímicos em *M. pruriens*, além do composto L-dopa, com várias atividades farmacológicas já foi anteriormente relatada e o uso de sementes de *Mucuna* em pacientes com doença de Parkinson tem vantagens por incluir vários esses metabólitos que podem tratar a doença por vias secundárias, que também podem contribuir para as

atividades neuroprotetoras com atividade antioxidantes e propriedades anti-inflamatórias, por exemplo, protegendo as células contra os radicais livres e a morte celular através de vários caminhos, auxiliando no tratamento, com efeitos positivos sobre as funções cognitivas (BEGA et al., 2014; LIEU et al., 2012; NATARAIAN et a., 2012; KASTURE et al., 2013; YADAV et al., 2013; PODDIGHE et al., 2014; KAVITHA e THANGAMANI, 2014; PODDIGHE et al., 2014; YADAV et al., 2014;).

Estudos envolvendo análises de estresse oxidativo poderão confirmar ou não esses achados preliminares comportamentais e direcionar a presente pesquisa para novas áreas de ensaio biológico. Portanto, a realização de outras pesquisas a fim de investigar a segurança e eficácia das dosagens e padronizar a utilização de *Mucuna pruriens*, desde sua obtenção até sua administração, são de suma importância para melhores resultados experimentais e possíveis aplicações clínicas, para minimizar os efeitos colaterais e adaptá-los às necessidades de cada paciente.

## CONCLUSÃO

O efeito das principais variáveis do processo que afetam a extração supercrítica e a eficácia do CO<sub>2</sub> supercrítico associado a etanol como cossolvente para a extração de compostos fenólicos, especialmente o L-dopa, no extrato de sementes de *Mucuna pruriens* foi investigado. De acordo com os resultados, a melhor condição de extração em termos de rendimento foi a 60°C, 350 bar e densidade igual a 912,8 kg/m<sup>3</sup> com rendimento igual a 3,70%. As elevadas concentrações de compostos fenólicos nos extratos indicam que o uso de um cossolvente polar modificou a seletividade e o poder solvente do fluido supercrítico, facilitando a extração desses compostos. Os resultados da análise de HPLC confirmam que as sementes de *Mucuna pruriens* são uma boa fonte de L-dopa natural, apesar da baixa concentração do composto nos extratos obtidos via tecnologia supercrítica, de 0,43 mg/g obtido da condição de 40°C, 350 bar e densidade igual a 975,7 kg/m<sup>3</sup>, compatível com o alto rendimento mássico de extrato. O papel benéfico na DP foi comprovado com os testes in vivo, avaliado por testes comportamentais. Apesar de o tratamento com Levodopa comercial surtir maiores resultados, os animais tratados com *Mucuna* promoveram alguma melhora nos sintomas da doença, principalmente em relação ao teste de grade vertical, aumentando os tempos de virada e tempo total de teste.

Diante disso, a extração supercrítica com dióxido de carbono e etanol para obtenção de extratos de sementes de *Mucuna* mostrou-se promissora, possibilitando o uso

do extrato de *Mucuna pruriens* para o tratamento de doença de Parkinson. A realização de outras pesquisas a fim de aprimorar a extração supercrítica, bem como investigar eficácia das sementes para o tratamento da doença de Parkinson são de suma importância para melhores resultados experimentais e possíveis aplicações tecnológicas.

## REFERÊNCIAS

- ABUSHOUK, A.I.; NEGIDA, A.; AHMED, H.; ABDEL-DAIM, M.M. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: Future applications in Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother*, v. 85, p. 635–645, 2017.
- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, A.; OSHODI, A. A. Variability in the physicochemical, nutrition and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry, Akure*, v. 89, n.4, p. 37–48, 2005.
- AERON, E.; KHARE, N.; KUMAR ARORA, D.; KUMAR MAHESHWARI. Practical use of CMC amended rhizobial inoculant for *Mucuna pruriens* cultivation to enhance the growth and protection against *Macrophomina phaseolina*, *J. Gen. Appl. Microbiol*, v. 58, n. 2, p. 121–127, 2012.
- AHMAD, M., MAHDI, A., SHUKLA, K., ISLAM, N., JAISWAR, S., & AHMAD, S. Effect of *Mucuna pruriens* on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertility and Sterility*, v. 90, n. 3, p. 627–635, 2008.
- ALLBUTT, H.N.; HENDERSON, J.M. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, v. 159(2), p. 195–202, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis AOAC International*, 2016.
- APPLIED SEPARATIONS. *Applied separations Spe-ed SFE operations manual*. Hamilton Street: Allentown, 2004.
- ASAE. AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by screening. *St. Joseph*, p. 562-564, 1998.
- AWARE, C.; PATIL, R.; GAIKWAD, S.; YADAV, S.; BAPAT, V.; JADHAV, J. Evaluation of L-dopa, proximate composition with in vitro anti-inflammatory and antioxidant activity of *Mucuna macrocarpa* beans: A future drug for Parkinson treatment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7(12), p. 1097–1106, 2017.
- AWARE, C.; PATIL, R.; VYAVAHARE, G.; GURAV, R.; BAPAT, V.; JADHAV, J. Processing Effect on L-DOPA, In Vitro Protein and Starch Digestibility, Proximate Composition, and Biological Activities of Promising Legume: *Mucuna macrocarpa*, *Journal of the American College of Nutrition*, 2019.
- BEGA, D., GONZALEZ-LATAPI, P., ZADIKOFF, C., & SIMUNI, T. A Review of the Clinical Evidence for Complementary and Alternative Therapies in Parkinson's Disease. *Current Treatment Options in Neurology*, v. 16(10), 2014.
- BERRY, C.; VECCHIA, C.; LA NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*. v. 17, p. 1115–1125, 2010.
- BETANCUR-ANCONA, D., GALLEGOS-TINTORÉ, S., DELGADO-HERRERA, A., PÉREZ-FLORES, V., CASTELLANOS RUELAS, A., & CHEL-GUERRERO, L. Some

physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *International Journal of Food Science & Technology*, v. 43, n. 5, p. 816–823, 2008.

BEZERRA, V.S.; LIMA, J.; MONTENEGRO, M.; ARAUJO, A.N.; SILVA, V.L. Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 1025–1031, 2003.

BHAT, R.; SRIDHAR, K. R.; TOMITA-YOKOTANI, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). *Food Chemistry*, v. 103, n. 3, p. 860-866, 2007.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Chiral and non chiral determination of Dopa by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, n. 3, p. 431-438, 2003.

BORGNAKKE, C.; SONNTAG, R. E. *Fundamentos da termodinâmica*. 7.ed. São Paulo: Blucher, p. 461, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol, Philadelphia*, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BROADLEY, K.J. The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacol. Therapeut.*, v. 125, p. 363-375, 2010.

BROWN, L. S.; HOLME, T. A. *Química geral aplicada à engenharia*. São Paulo: Cengage Learning, p. 651, 2009.

BRUNNER, G. Stofftrennung mit uberkritischen Gasen (Gasextraktion). *Chem.-Ing.-Tech.*, v. 59, n. 1, p. 12-22, 1987.

BRUNNER, G. *Gas extraction: An Introduction to fundamentals of supercritical Fluids and the Application to Separation Process*. 1ª. Ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, p. 387, 1994.

BRUNNER, G. *Supercritical Fluids: Technology and Application to Food Processing*. *J. Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.

CARRETE, H. J. A doença de Parkinson e os parkinsonismos atípicos: a importância da ressonância magnética como potencial biomarcador. *Radiol Bras* [online], v.50, n.4, p.5-6, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and relatedcontroversy: natural and synthetic compounds, screening and analysismethodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARVALHO JR, R.N.; MOURA, L.S.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity.*Journal of Supercritical Fluids*, v. 35, p. 197-204, 2005.

CARVALHO, M.M; FILIPA L CAMPOS, F.L.; COIMBRA, B. PEGO, J.M.; RODRIGUES, C.; LIMA, R.L.; RODRIGUES, A.J.; SOUSA, N.; SALGADO, A.J. Behavioral characterization of the hydroxidopamine modelo of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor déficits. *Molecular Neurodegeneration.*, v. 8, p. 14. 2013.

CARVALHO, A.V.; SILVEIRA, T. F; SOUSA. S. H. B; MORAES, M. R.; GODOY, H.T. Phenolic compounds and antioxidant activity of bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.) genotypes. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 54, p. 1-9, 2016.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, n. 1, p. 43–49, 2007.

CASSANI, E.; CILIA, R.; LAGUNA, J.; BARICHELLA, M.; CONTIN, M.; CEREDA, E.; PEZZOLI, G. *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease: low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. *J Neurol Sci.*, v. 365, p. 175–180, 2016.

CHANÁ, P. Advances in the medical treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disorders*, v. 15, p. S22-S25, 2009.

CHIKAGWA-MALUNGA, S. K.; ADESOGAN, A. T.; SOLLENBERGER, L. E.; BADINGA, L. K.; SZABO, N. J.; LITTELL, R. C. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*: 1. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Animal Feed Science and Technology*, v. 148, n. 1, p. 34-50, 2009.

CILIA, R.; LAGUNA, J.; CASSANI, E.; CEREDA, E.; POZZI, N.G.; ISAIAS, I.U.; CONTIN, M.; BARICHELLA, M.; PEZZOLI, G. A double-blind, randomized, controlled, crossover study. *Neurology Aug.*, v. 89, n. 5, p. 432-438, 2017.

CILIA, R.; LAGUNA, J.; CASSANI, E.; CEREDA, E.; RASPINI, B.; BARICHELLA, M.; PEZZOLI, G. Daily intake of *Mucuna pruriens* in advanced Parkinson's disease: A 16-week, noninferiority, randomized, crossover, pilot study, *Parkinsonism and Related Disorders*, 2018.

COOK, C.; STETLER, C.; PETRUCELLI, L. Disruption of protein quality control in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012.

COSTA, P.; GROSSO, C; GONÇALVEZ, S.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; BERNARDO-GIL, M.G.; ROMANO, A. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for there covery of bioactive compounds from *Lavandulaviridis* L'Hér. *Food Chemistry*, v.135, p. 112–121, 2012.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P.; GONÇALVES, C. B.; DE OLIVEIRA, N. A.; DE OLIVEIRA, A. L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from green coffee beans: solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2017.

CORSO, M. P.; SILVA, E. A.; KLEN, M. R. F.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil

using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 1, p. 56-61, 2010.

CUNHA COSTA, A.C.; OLIVEIRA, L.O.D.; DOREA, M.A.; LEITE, G.M.O.; AMORIM, R.P.D.; MARTINS NETO, E.D.S.; LIMA NASCIMENTO JÚNIOR; SILVA, R.C.; SILVEIRA, E.L.; FONTELLES, M.J. Supercritical carbon dioxide extract of *mucuna pruriens* inhibits brain cancer tumour growth in rats. *European Society for Medical Oncology*, 2018.

ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. *Termodinâmica*. 5. ed. São Paulo: 740 p. McGraw-Hill, 2006.

DAHOUDA, M.; TOLEBA, S.S.; YOUSSEF A.K.I.; HAMBUECKERS, A.; DANGOU-SAPOHO, R.; MARTIN, G.B.; FILLET, M.; HORNICK, J.L. Nutrient digestibility of *Mucuna (Mucuna pruriens var. utilis)* bean in Guinea fowl (*Numida meleagris*, L): effects of heat treatment and levels of incorporation in diets. *Brit. Poultry Sci.*, v. 50, n. 5, p. 564–572, 2009.

DAMODARAN, M; RAMASWAMY, R. Isolation of L-dopa from the seeds of *Mucuna pruriens*. *Biochem J.*, p. 2149–2451, 1937.

DE MELO, M.M.R.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids*. v. 92, p. 115–176, 2014.

DEXTER, D. T., & JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132-144, 2013.

DHARMARAJAN, S.K.; ARUMUGAM, K.M. Comparative evaluation of flavone from *mucuna pruriens* and coumarin from *Ionidium suffruticosum* for hypolipidemic activity in rats fed with high fat diet. *Lipids in Health and Disease*. v. 11, p. 126, 2012.

DI STEFANO, A.; SOZIO, P.; CERASA, L.S. Antiparkinson prodrugs. *Molecules*. v. 13, n. 1, p. 46-68, 2008.

DUBA, K.S.; FIORI, L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *J. Supercrit. Fluids.*, v. 98, p. 33–43, 2015.

ELTRINGHAM, W.; CATCHPOLE, O. Processing of fish oils by supercritical fluids. In: Martínez. J. L. *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. CRC Press, Boca Raton, Florida. cap. 5, p. 141-188, 2008.

ERIKSEN, J.; JØRGENSEN, T.N.; GETHER, U. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J. Neurochem.*, v. 113, p. 27–41, 2010.

ESSA, M.; BRAIDY, N.; BRIDGE, W.; SUBASH, S.; MANIVASAGAM, T.; VIJAYAN, R.; AL-ADAWI, S.; GUILLEMIN, G.J. Review of natural products on Parkinson's disease pathology. *The Journal of Aging Research and Clinical Practice*, v. 3, n. 3, p. 127-136, 2014.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z.A.; WAHID, A. Siddique KHM. The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Manag Sci.*, v. 67, p. 493-506, 2011.

FERREIRA, S. R. S.; CARDOZO FILHO, L.; CABRAL, V. F. Equilíbrio es fases para sistemas multicomponentes: usando equações de estado. In: MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G. *Fundamentos de engenharia de alimentos*. Atheneu, São Paulo. v. 6, cap.7, p. 217-259, 2013.

FIORI, L.; LAVELLI, V.; DUBA, K.S.; SRI HARSHA, P.S.C.; MOHAMED, H.B.; GUELLA, G. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from seeds of six grape cultivars: modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents, *J. Supercritical Fluids*, v. 94, p. 71–80, 2014.

GALLEGO, R., BUENO, M., & HERRERO, M. Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – an update. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019.

GANDHI, N.P.; VAIDYA, A.D.B. Management of Parkinson's disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. *J Ethnopharm.* v. 197, p. 46-51, 2017.

GARCÍA-RISCO, M. R. G.; VICENTE, G.; REGLERO, G. FORNARI, T. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, n. 3, p. 949-954, 2011.

GARCIA, V.A S.; CABRAL, V.F.; ZANOELO, E.F.; SILVA, C.; CARDOZO-FILHO, L. “Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbono dioxide to increase the concentration of L-Dopa in the defatted meal,” *J. Supercrit. Fluids*, v. 69, p. 75-81, 2012.

GARCIA, V.A.S., C. SILVA AND L. CARDOZO-FILHO. “Extraction of mucuna deeringiana seed oil using supercritical carbon dioxide,” *Acta Scien. Technol.*, v. 35, p. 499-505, 2013.

GAUTAM M, CHANDEL M, AZMI W. Therapeutic role of L-DOPA produced as a secondary metabolite from different legumes and plant sources. *Ann Phytomed.* v. 1, p. 1-8, 2012.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin c in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GIL-CHAVEZ, G. J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, p. 5-23, 2013.

GOLBABAPOUR, S.; HAJREZAIE, M.; HASSANDARVISH, P., et al., “Acute Toxicity and Gastroprotective Role of *M. pruriens* in Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injuries in Rats,” *BioMed Research International*, v. 2013, p. 13, 2013.

GONZÁLEZ, B.O.; DIAZ, G.C. Análisis económico y producción del maíz (*Zea mays* L.) asociado con mucuna (*Stizolobium aterrimum*) en siembra directa y dos sistemas de fertilización nitrogenada. *Ciencia y Tecnología*, v. 1, n. 1, p. 37-41, 2008.

GRANGER, D.L., et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Greiss reaction methods. *Enzymol.*, v. 268, p. 142–151, 1996.

GURUMOORTHY, P; JANARDHANAN, K.; MYHRMAN, R.V. Effects of differential processing methods on L-dopa and protein quality in velvet bean, an underutilized pulse. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, v. 41, p. 588–596, 2008.

HAUSER, R.A.: Levodopa: past, present, and future. *Eur. Neurol.* v. 62, p. 1–8, 2009.

HAUSER, R.A. Early pharmacologic treatment in Parkinson's disease. *American Journal Managed Care*, v.16, p. S100-S107, 2010.

HERRERO M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by- products, algae and microalgae. *FoodChemistry*, v.98, p.136-148, 2006.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 67-83, 2013.

HU, Q.; GUANGHUI, W. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* p. 5–14, 2016.

HUANG, Z.; SHI, X.H.; JIANG, W.J. Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 2–26, 2012.

HUISDEN, C. M.; ADESOGAN, A. T.; GASKIN, J. M.; COURTNEY, C. H.; RAJI, A. M.; KANG, T. Effect of feeding *Mucuna pruriens* on helminth parasite infestation in lambs. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. 3, p. 669-673, 2010.

HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.*, v. 50, n. 2, p. 275-331, 1996.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods of characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

INGLE, P.K. L-dopa bearing plants. *Nat Prod Rad*; v. 2: p. 126-33, 2003.

IRAKLI, M. N.; SAMANIDOU, V. F.; BILIADERIS, C. G.; PAPADOYANNIS, N. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 1603-1611, 2012.

JANSEN, R.L.M.; BROGAN, B.; WHITWORTH, A.J.; OKELLO, E.J. Effects of five ayurvedic herbs on locomotor behaviour in a drosophila melanogaster Parkinson's disease model. *Phytother Res.* v. 28, n. 12, p. 1789-1795, 2014.

- JENNER P. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Current Opinion Neurology*, v.16, p. S3-S7, 2003.
- JOERS, V., TANSEY, M. G., MULAS, G., AND CARTA, A. R. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol.*, v. 15, 2016.
- JOHNSON, S., PARK, H., DASILVA, N., VATTEM, D., MA, H., & SEERAM, N. Levodopa-Reduced *Mucuna pruriens* Seed Extract Shows Neuroprotective Effects against Parkinson's Disease in Murine Microglia and Human Neuroblastoma Cells, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Nutrients*, v. 10(9), p.1139, 2018.
- KALA, K. B.; MOHAN, V. R. Effect of microwave treatment on the antinutritional factors of the two accessions of velvet bean *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. Utilis (Wall. Ex. Wight) bak. Ex burck. *Int Food Res J.*, v. 19, p. 961-9, 2012.
- KALIDASS, C.; MOHAN, V.R. Nutritional and antinutritional composition of itching bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC var. *pruriens*): An underutilized tribal pulses in Western Ghats, Tamil Nadu. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, v. 14, p. 279-279, 2011.
- KASTURE, S; PONTIS, S.; PINNA, A.; SCHINTU, N.; SPINA, L.; LONGONI, R.; SIMOLA, N.; BALLERO, M.; MORELLI, M. Assessment of symptomatic and neuroprotective efficacy of *Mucuna pruriens* seed extract in rodent model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, v.15, n.2, p.111-122, 2009.
- KASTURE, S.; MAHALAXMI MOHAN, M.; KASTURE, V. *Mucuna pruriens* seeds in treatment of Parkinson's disease: pharmacological review, *Orient Pharm Exp Med.*, v. 13 p. 165–174, 2013.
- KAVITHA C, THANGAMANI C. Amazing bean “*Mucuna pruriens*”: a comprehensive review. *J Med Plants Res.*, v. 8, p. 138-43, 2014.
- KIM, Y. S., et al. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport.*, v. 9, p. 2387-2390, 1998.
- KIM, S. T.; SON, H. J.; CHOI, J. H.; JI, I. J.; HWANG, O. Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain. Res.*, v. 1306, p. 176-83, 2010.
- KOSTRZEWA R.M.; NOWAK P.; KOSTRZEWA J.P.; KOSTRZEWA R.A.; BRUS R. Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids.*, v. 28, n. 2, p. 157 – 164, 2005.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process*, Melbourne, 2010.
- KRISHNAVENI, R.; RATHOD, V.; THAKUR, M.; NEELGUND, Y. Transformation of L-tyrosine to L-DOPA by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation. *Curr Microbiol*, v. 58, p. 122–128, 2009.

- LAMPARIELLO, R.L.; CORTELAZZO, A.; GUERRANTI, R.; STICOZZI, C.; VALACCHI, G. The magic velvet bean of *Mucuna pruriens*. *J Tradit Compl Altern Med.*, v. 2, n 4, p. 331-339, 2012.
- LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies— a practical review. *Talanta*, v.53, p.771-782, 2001.
- LAROZE, L. E.; DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; ZÚÑIGA, M. E.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European food research and technology*. v.231, p.669-677, 2010.
- LEE, Y.H.; CHARLES, A.L.; KUNG, H.F.; HO, C.T.; HUANG, T.C. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Ind Crops Prod*, v. 31, p. 59 – 64, 2010.
- LEOPOLDINI, M., RUSSO, N., TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.
- LIEU, C. A.; KUNSELMAN, A.R.; MANYAM, B.V.; VENKITESWARAN, K.; SUBRAMANIAN, T. A water extract of *Mucuna pruriens* provides long-term amelioration of parkinsonism with reduced risk for dyskinesias. *Parkinsonism Relat. Disord.*, Devon, v.16, n.7, p.458-465, 2010a.
- LIEU, C.A.; KUNSELMAN, A.R.; MANYAM, B.V.; VENKITESWARAN, K.; SUBRAMANIAN, T. A water extract of *Mucuna pruriens* provides long-term amelioration of parkinsonism with reduced risk for dyskinesias. *Parkinsonism Relat Disord.*, v. 16, p. 458–465, 2010b.
- LIEU, C.A.; VENKITESWARAN, K.; GILMOUR, T.P.; RAO, A.N.; PETTICOFFER, A.C.; GILBERT, E.V.; DEOGAONKAR, M.; MANYAM, B.V.; SUBRAMANIAN, T. The antiparkinsonian and antidyskinetic mechanisms of *Mucuna pruriens* in the MPTP-treated nonhuman primate, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2012a.
- LIEU, C. A.; VENKITESWARAN, K.; GILMOUR, T. P.; RAO, A. N.; PETTICOFFER, A. C.; GILBERT, E. V.; ... SUBRAMANIAN, T. The Antiparkinsonian and Antidyskinetic mechanisms of *mucuna pruriens* in the MPTP-treated nonhuman primate. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012b.
- LIU, W.; MA, H.; DASILVA, N.A.; ROSE, K.N.; JOHNSON, S.L.; ZHANG, L. et al. Development of a neuroprotective potential algorithm for medicinal plants. *Neurochem Int*, v. 100, p. 164-77, 2016.
- LONGHI, G.J.; PEREZ, E.; DELIMA, J.J.; CANDIDO, L.M.B. *Brazilian J. Pharm. Sci.*, v. 47, p. 535–544, 2011.
- LOTHARIUS, J.; DUGAN, L.L.; O'MALLEY, K.L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J. Neurosci.*, v. 19, n. 4, p. 1284-1293, 1999.

- MACHMUDAH, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as entrainer, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 45, p. 3652–3657, 2006.
- MAJEKODUNMI, S. O.; OYAGBEMI, A. A.; UMUKORO, S.; ODEKU, O. A. Evaluation of the anti-diabetic properties of *Mucuna pruriens* seed extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.4, n. 8, p. 632636, 2011.
- MANYAM, B.V.; DHANSEKARAN, M.; HARE, T.A. “Neuroprotective Effects of the Antiparkinson Drug *Mucuna pruriens*.” *Phytotherapy Research*. v. 18, p. 706, 2004.
- MANYAM, B. V.; DHANASEKARAN, M.; CASSADY, J. Scott & White Memorial Hospital; The Ohio State University. Extract of *Mucuna* Species and the use Thereof as Anti-parkinson's Disease Pharmaceutical, 2005.
- MATSUMOTO, H. The mechanisms of phytotoxic action and selectivity of non-protein aromatic amino acids L-DOPA and m-tyrosine. *J Pestic Sci*, v. 36, p. 1–8, 2011.
- MELO, S. A. B. V.; MELO, R. L. F. V.; COSTA, G. M. N.; ALVES, T. L. L. Solubility of L – dopa in supercritical carbon dioxide: prediction using a cubic equation of state. *Journal of Supercritical Fluids*, Aracaju, v. 34, n. 1, p. 231 – 236, 2005.
- MEIRELES, M.A.A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, José (Org.). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. Boca Raton: CDC Press – Taylor and Francis Group, p. 243-274, 2008.
- MEISER, J., WEINDL, D., HILLER, K.: Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signaling*, v. 11, p. 34, 2013.
- MHEMDI, H.; RODIER, E.; KECHAOU, N.; FAGES, J. A supercritical tuneable process for the selective extraction of fats and essential oil from coriander seeds, *J. Food Engineering*, v. 105, p. 609–616, 2011.
- MUSHTAQ, M.N.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Bioactive l-DOPA induced quinoprotein formation to inhibit root growth of cucumber seedlings. *J Pestic Sci*, v. 38, p. 68–73, 2013.
- NAGATSUA, T.; SAWADAB, M. L-dopa therapy for Parkinson’s disease: past, present, and future. *Parkinsonism Relat. Disord.*, v. 15, p. 3–8, 2009.
- NAHAS, T.R. O teste do campo aberto. In: XAVIER, G.F. *Técnicas para o estudo do sistema nervoso*. São Paulo: Editora Plêiade, v.1, 1999.
- NATARAJAN, K.; NARAYANAN, N.; RAVICHANDRAN, N. Review on “*Mucuna*”—The wonder plant. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, v. 17, p. 86–93, 2012.
- NGATCHIC, M.T.J.; DONGMO, S.S.; NJINTANG, Y.N.; MAOUNDOMBAYE, T.; OBEN, J.; MBOFUNG, F.C.M. Evaluation of some selected blood parameters and histopathological of liver and kidney of rats fed protein-substituted *Mucuna* flour and derived protein rich product. *Food Chem. Toxicol.*, v. 57, p. 46–53, 2013.
- NIPORNRAM, S.; TOCHAMPA, W.; RATTANATRAIWONG, P.; SINGANUSONG, R. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from

mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel, *Food. Chem.*, v. 241, p. 338-345, 2018.

NISHIHARA, E.; PARVEZ, M.M.; ARAYA, H.; KAWASHIMA, S.; FUJII, Y. L-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)alanine (L-DOPA), an allelochemical exuded from velvetbean (*Mucuna pruriens*) roots. *Plant Growth Regul.*, v. 45, p. 113-20 2005.

NWAOGUIKPE, R.N.; BRAIDE, W.; UJOWUNDU, C.O. The Effects of Processing on the Proximate and Phytochemical Compositions of *Mucuna pruriens* Seeds (Velvet Beans). *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 10, p. 947-951, 2011.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; RODRIGUEZ, M.; LANCIEGO, J.L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C.W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, v. 23, p. 8–19, 2000.

OBOGWU, MB.; AKINDELE, A.J.; ADEYEMI, O.O. Hepatoprotective and in vivo antioxidant activities of the hydroethanolic leaf extract of *mucuna pruriens* (Fabaceae) in antitubercular drugs and alcohol models. *Chinese Journal of Natural Medicines*. v. 12, p. 273-283, 2014.

OJIAKO, O.A.; ANUGWEJE, K.; IGWE, C.U.; ALISI, C.S. Evaluation of the amino acid profile and haemoglobin polymerization inhibition potential of some Nigerian legumes. *Br. J. Pharm. Res.*, v. 2, n. 2, p. 80-88, 2012.

OSORIO-TOBÓN, J. F., CARVALHO, P. I. N., ROSTAGNO, M. A., PETENATE, A. J., & MEIRELES, M. A. A. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L.) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 95, p. 167–174, 2014.

OVALATH, S.; DEEPA, P. The history of parkinsonism: descriptions in ancient Indian medical literature. *Mov Disord.*, v. 28, n. 5, p. 566-568, 2013.

PARK, K.H.; PARK, H.J.; SHIN, K.S.; CHOI, H.S.; KAI, M.; LEE, M.K. Modulation of PC12 cell viability by forskolin-induced cyclic AMP levels through ERK and JNK pathways: an implication for L-DOPA-induced cytotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Toxicol Sci*, v. 57, p. 128:247, 2012.

PATIL, R.R.; GHOLAVE, A.R.; JADHAV, J.P.; YADAV, S.R.; BAPAT, V.A. *Mucuna sanjappae* (Aitawade & Yadav): a new species of *Mucuna* with promising yield of anti-Parkinson's drug L-DOPA. *Genet Resour Crop Evo.*, v. 62, n. 1, p. 155-62, 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Cambridge: Academic Press, v. 7, 2013.

PENG, D.Y.; ROBINSON, D.B. A New Two-Constant Equation of State. *Industrial and Engineering Chemical Fundamental*, v.15, p.59-64, 1976.

PEREIRA, C. G., & MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3(3), p. 340-337, 2010.

PEREIRA, C. G. Fundamentos de engenharia de alimentos. Atheneu, São Paulo. v. 6, cap.7, p. 217-259, 2013.

PEREIRA, C. G.; PRADO, J. M.; MEIRELES, A. J. A.; MEIRELES, M. A. A. Extração sólido-líquido. In: TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELES, A. J. A.; PESSOA FILHO, P. A. Operações unitárias na indústria de alimentos. Livros técnicos e científicos (LTC). v. 1, cap.18, p. 168-208. Rio de Janeiro, 2016.

PORTER, JORDAN.; ARREGUIN, SHELLY.; PIERPONT, CORTLANDT G. Ferric iron complexes of dopamine and 5,6-dihydroxyindole with nta, edda, and edta as ancillary ligands. Inorganica Chimica Acta. Colorado USA, 2010.

PODDIGHE, S.; DE ROSE, F.; MAROTTA, R.; RUFFILLI, R.; FANTI, M.; SECCI, P.P.; MOSTALLINO, M.C.; SETZU, M.D.; ZUNCHEDDU, M.A.; COLLU, I.; et al. Mucuna pruriens (Velvet bean) rescues motor, olfactory, mitochondrial and synaptic impairment in PINK1B9 Drosophila melanogaster genetic model of Parkinson's disease. 2014.

PUGALENTHI, M.; VADIVEL, V.; SIDDHURAJU, P. Alternative food/feed perspectives of na underutilized legume Mucuna pruriens var. utilis — a review, Plant Foods Hum. Nutr., v. 60, n. 4, p. 201–218, 2005.

PUGALENTHI, M.; VADIVEL, V.; SIDDHURAJU, P. Plants Food Hum. Nutr., v. 60, p. 201–218, 2007.

PUKALSKAS, A. et al. Identification of radical scavengers in sweet grass (Hierochloa odorata). J. Agric. Food Chem., v. 50, n. 10, p. 2914-2919, 2002.

PULIKKALPURA, H.; KURUP, R.; MATHEW, P.J.; BABY, S. Levodopa in Mucuna pruriens and its degradation. Sci Rep 2015;5: 11078, 2015.

RAI, A.; PUNASE, K.D.; MOHANTY, B.; BHARGAVA, R. Evaluation of models for supercritical fluid extraction. International Journal Heat Massachusetts Transactions, 72: 274–287, 2014.

RAINA, AP.; KHATRI, R. Quantitative determination of L-DOPA in seeds of Mucuna pruriens germplasm by high performance thin layer chromatography. Ind. J. Pharm. Sci., v. 73, p. 459–462, 2011.

RAINA, A. P.; TOMAR, J. B.; DUTTA, M. Variability in Mucuna pruriens L. germplasm for L-Dopa, an anti parkinsonian agent. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 59, n. 6, p. 1207-1212, 2012.

RAJESHWAR, Y.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K. In vitro lipid peroxidation and antimicrobial activity of Mucuna pruriens seeds. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, v. 4, p. 32–35, 2005.

RAMYA, K.B.; S. THAAKUR. “Herbs Containing L- DOPA: An Update.” Ancient Science of Life. v. 27, n. 1, p. 50–55, 2007.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Antioxidant enzyme response studies in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stressed porcine muscle tissue following treatment with fava bean sprout extract and l-Dopa. Journal of Food Biochemistry, v.30, p. 671–698, 2006.

RAO, S.S.; HOFMANN, L.A.; SHAKIL, A. Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *American Family Physician*, v. 74, n. 12, p. 2046-2054, 2006.

RASCOL, O.; LOZANO, A.; STERN, M.; POEWE, W. Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov Disord.*, v. 26, p. 1072–1082, 2011.

RENATA, L. T.; ALEXANDRE, S. S.; ANA, R. N. C.; ALEXANDRE, R. P. S.; JAILANE, DE S. A. Nutritional composition, phytochemicals and microbiological quality of the legume, *Mucuna pruriens*. *African Journal of Biotechnology*, v. 14(8), p. 676–682, 2015.

RICHARDSON, J.R.; HOSSAIN, M.M. Microglial ion channels as potential targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Plast.*, 2013.

RIZELIO, V. et al. Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Braz. J Med Biol Res.* v. 43, n. 1, p. 85-95, 2010.

RODRIGUEZ, P. C.; PEREIRA, D.B.; BORGKVIST, A.; WONG, M.Y.; BARNARD, C.; SONNERS, M.S.; ZHANG, H.; SAMES D.; SULZER, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 110, p. 870-875, 2013.

ROSA, P. T. V.; PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; R. L. SMITH, JR.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L. J.; PETERS, C. J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M. A. A. *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*, CRC Press, New York. c. 6, p. 269-402, 2009.

SALGIN, U.; SALGIN, S.. Effect of main process parameters on extraction of pine kernel lipid using supercritical green solvents: solubility models and lipid profiles, *J. Supercritical Fluids*, v. 73, p. 18–27, 2013.

SANTIAGO, R.M; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.S.; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Progress in neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry.*, v. 34, p. 1104-1114, 2010.

SANTOS, J.; OLIVEIRA, M.B.; IBANEZ, E.; HERRERO, M. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage, *J. Chromatogr. A.*, v. 13, p. 118-131, 2014.

SATHIYANARAYANAN, L.; ARULMOZHI, S. *Mucuna pruriens* A Comprehensive Review. *Pharmacog. Rev.*, v. 1, n. 1, p. 157-162, 2007.

SELMA, A.; ESRA, C.; EMINE, B.; ULKU, M. Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *En-zyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 683-687, 2007.

SHAVE, P.A.; TER-RUMUM, A.; ENOCH, M.I. Effects of time of intercropping of mucuna (*Mucuna cochinchinensis*) in maize (*Zea mays*) for weed and soil fertility management. *International Journal of Agriculture and Biology.*, v. 14, p. 469-772, 2012.

- SIMUNI, T.; HURTIG, H. "Levodopa: Pharmacologic Miracle Four Decades Later. In: Factor SA, Parkinson's Disease-Diagnosis and Clinical Management". Weiner WJ (eds). Demos, New York, p. 471–490, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reEAGnt. *Methods in Enzymology*, v. 299, p.152-178, 1999.
- SRIDHAR, K.R.; BHAT, R. AGROBOTANICAL. Nutritional and bioactive potential of unconventional legume—Mucuna. *Livest Res Rural Dev.*, v. 19, p. 1–36. Article 126, 2007.
- SOVOVÁ, H. Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO<sub>2</sub>: I. Modeling of Extraction Curves. *Chem. Engineering. Science*, v. 3, n. 49, p. 409 - 414, 1994.
- SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, p. 35- 55, 2005.
- SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times, *J. Supercritical Fluids*, v. 66, p. 73–79, 2012
- STOWE, R.; IVES, N.; CLARKE, C.E.; DEANE, K.; HILTEN, V.; WHEATLEY, K.; GRAY, R.; HANDLEY, K.; FURMSTON, A. Evaluation of the efficacy and safety of adjuvant treatment to levodopa therapy in Parkinson's disease patients with motor complications. *Cochrane Database Systematic. Reviews*, v.7, p.7-16, 2010.
- SURESH, S.; PRAKASH, S. Effect of mucuna pruriens (Linn.) on sexual behavior and sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rat. *The Journal of Sexual Medicine.*, v. 9, p. 3066-3078, 2012.
- SURWASE, S.N. AND JADHAV J.P. Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium Bacillus sp. JPJ. *Amino Acids*, 41, 495-506, 2010.
- SURWASE, S.N.; JADHAV, J.P. Optimization of L-DOPA production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *Microb Biotech.*, v. 5, p. 731–737, 2012.
- TAN, N.H.; FUNG, S.Y.; SIM, S.M.; MARINELLO, E.; GUERRANTI, R.; AGUIYI,J.C. The protective effect of Mucuna pruriens seeds against snake venom poisoning. *Journal of Ethnopharmacology*, v.123, p.356-358, 2009.
- TAPIAS, V.; CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 35, 1162-1176, 2014.
- TEIXEIRA, A.A.; RICH, E.C.; SZABO, N.J. Water extraction of l-Dopa from Mucuna bean, *Tropical Subtropical Agroecosyst.*, v. 1, p. 159, 2003.

TEMELLI, F.; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, O. Supercritical technologies for further processing of edible oils. *Bailey's industrial oil and fat products*, ed Shahidi, Hoboken, NJ:Wiley, p. 397-432, 2005.

THARAKAN, B.; DHANASEKARAN, M.; MIZE-BERGE, J.; MANYAM, B.V. Anti-Parkinson botanical *Mucuna pruriens* prevents levodopa –induced plasmid and genomic DNA damage. *Phytother. Res.*, London, v. 21, n. 12, p. 1124-1126, 2007.

THÓMAS-BARBERAN, F. A.; ANDRES-LACUEVA, C. Polyphenols and health: Current state and progress. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 60, p. 8773-8775, 2012.

TURNER, C.; KING, J.W.; MATHIASSEN, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *J. Chromatogr.*, v. 936, p. 215–237, 2001.

UMOREN, E. U.; OKOKON, O. E.; JOSEPH, C. O.; ENEFIOK, D. E.; SHADRACH, O. O. CHANGES. In *Nutritional Characteristics Of The Horse-Eye Bean [Mucuna Urens (L.) Medik] Subjected To Different Processing Methods*. *International Journal of Food Properties*, v. 11, p. 901–909, 2008.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 5, n. 1, p. 107 -110, 1968.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain. Res.*, v. 24, n. 3, p. 485-493, 1970.

URSZULA, Z.; SYLWIA, M.; MAŁGORZATA, N.; MICHAŁ, S. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi J Biol Sci*, v. 23, 2015.

VADIVEL, V.; BIESALSKI, K. Bioactive Compounds In Velvet Bean Seeds: Effect Of Certain Indigenous Processing Methods. *Int. J. Food Prop.*, v. 15, p. 1069–1085, 2012.

VAIDYA, A.B.; RAJGOPALAN, T.G.; MANKODI, N.A.; ANTARKAR, D.S.; TATHED, P.S.; PUROHIT, A.V.; et al. Treatment of Parkinson's disease with the cowhage plant-*mucuna pruriens* Bak. *Neurology India.*, v. 26, p. 171-176, 1978.

VILHENA, R.O.; PONTES, F.L.D.; MARSON, B.M.; RIBEIRO, R.P.; CARVALHO, K.A.E.; CARDOSO, M.A.; PONTAROLO, R. A new HILIC-MS/MS method for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 967, p. 41–49, 2014.

WIETZIKOSKI, E. C. Estudo comparativo do comportamento ipsiversivo e contraversivo nos modelos da 6-OHDA e MPTP da Doença de Parkinson. *Dissertação (Mestrado em Farmacologia)*. Paraná: Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências Biológicas, 2006.

WILLS, E.D. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.*, v. 99, n. 3, p. 667-676, 1966.

WU, M.; ZHOU, X. J.; KONNO, R.; WANG, Y. X. D-dopa is unidirectionally converted to L-dopa by D-amino acid oxidase, followed by dopa transaminase. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, n. 11, p. 1042–1046, 2006.

YADAV, S. K.; PRAKASH, J.; CHOUHAN, S.; SINGH, S. P. Mucuna pruriens seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat-induced Parkinsonian mouse model. *Neurochem Inter.*, v. 62, p. 1039–1047, 2013.

YADAV, S. K.; PRAKASH, J.; CHOUHAN, S.; WESTFALL, S.; VERMA, M.; SINGH, T. D.; et al. Comparison of the neuroprotective potential of Mucuna pruriens seed extract with estrogen in 1 methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mice model. *Neurochem. Int.*, v. 65, p. 1–13, 2014.

ZHOU, J.L.; MASKAOUI, K.; LUFADJEU, A. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, v. 731, p. 32–39, 2012.

## ANEXO I

Cromatogramas das sementes *in natura*, das tortas pós-extração e dos extratos de *Mucuna pruriens* obtidos das extrações supercríticas.

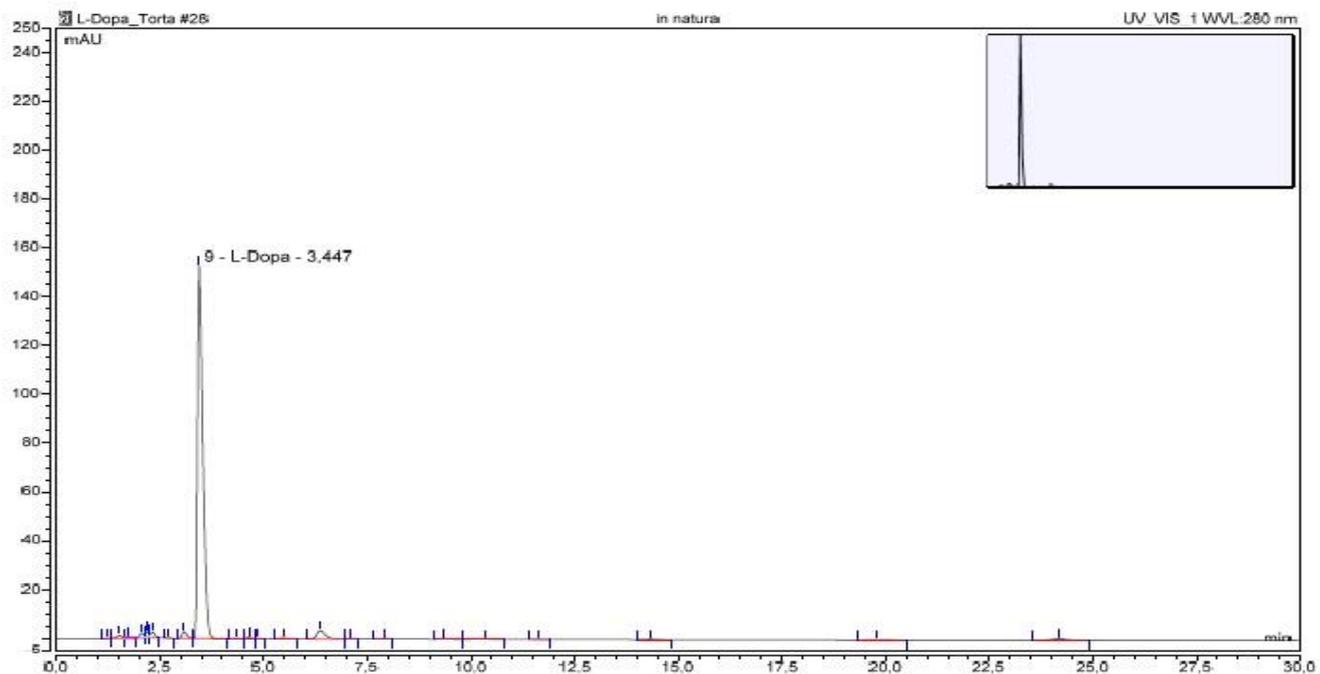


Figura 13: Cromatograma quantificação do composto L-dopa nas sementes *in natura*.

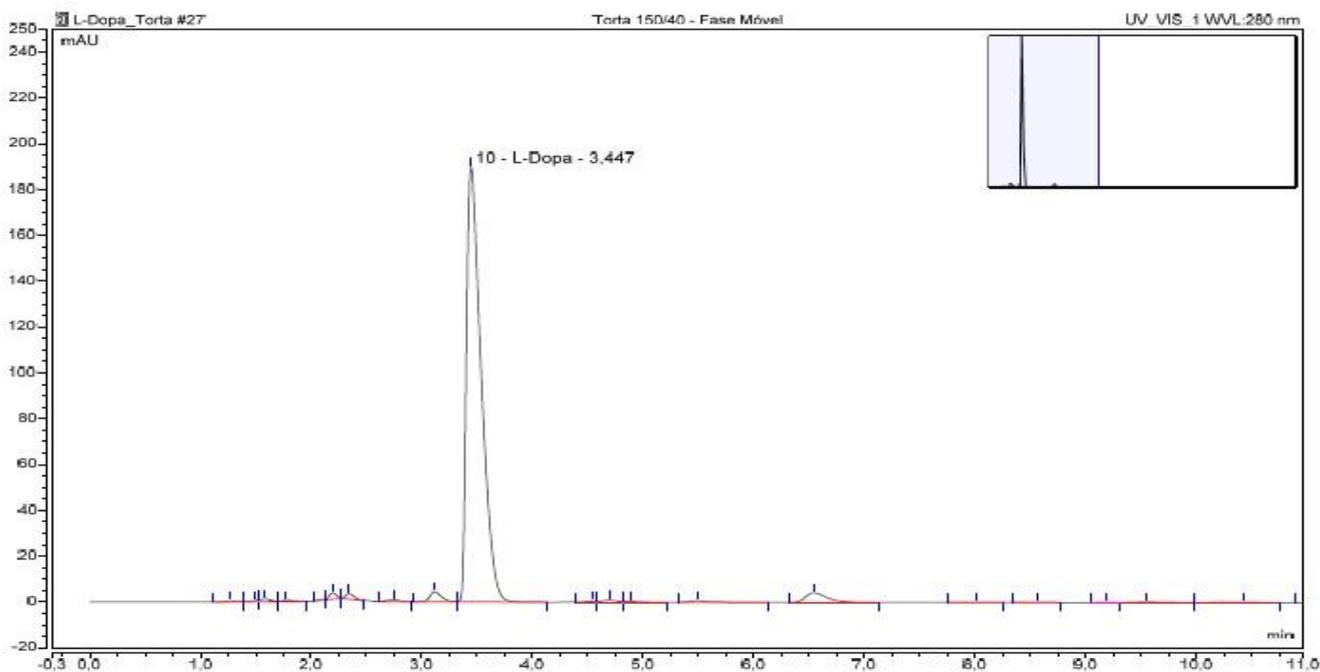
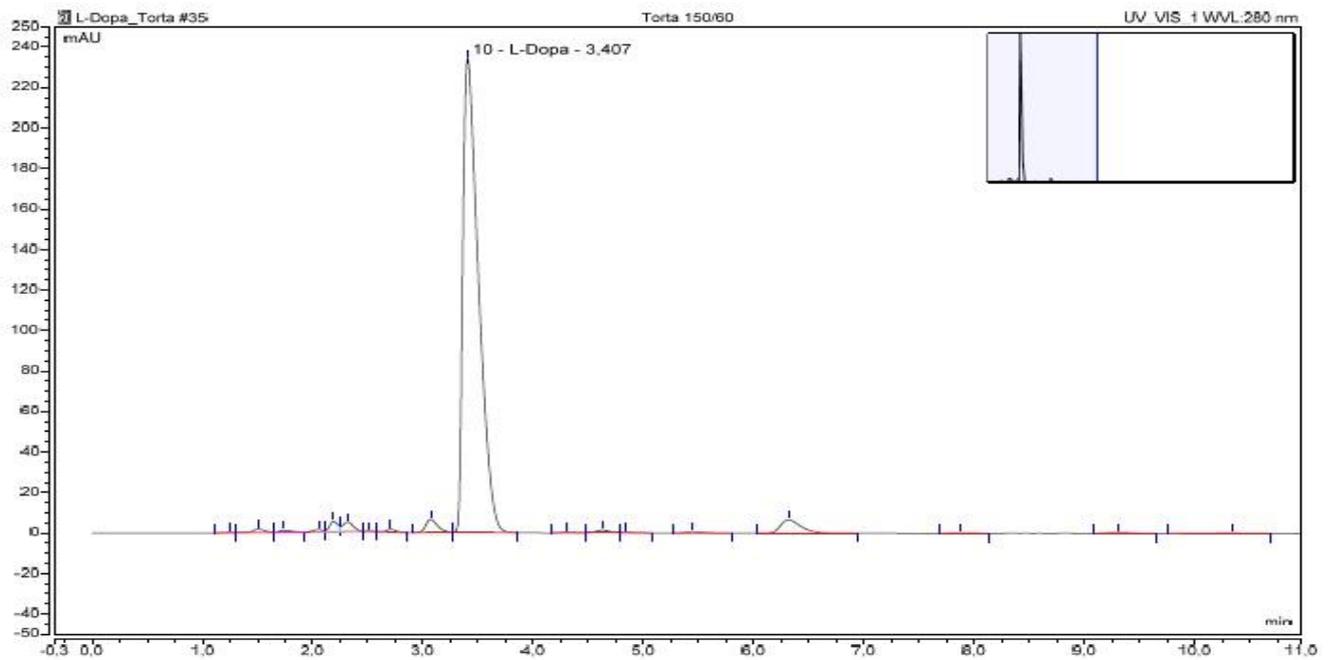
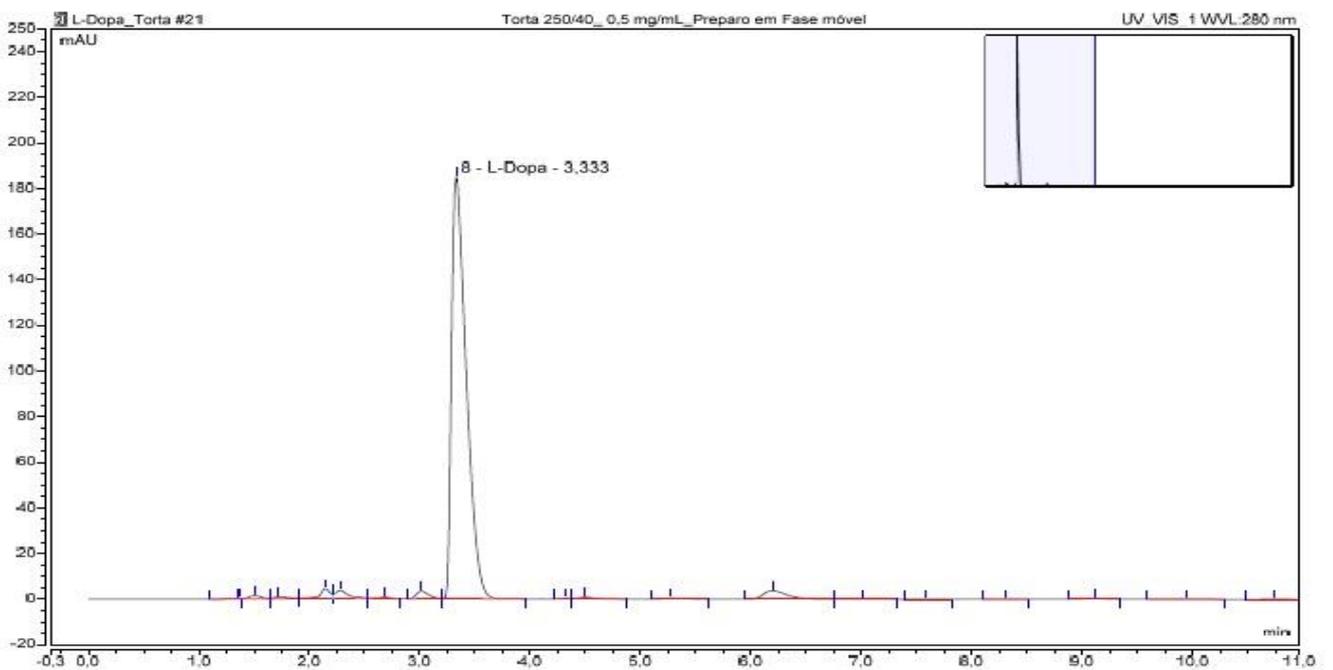


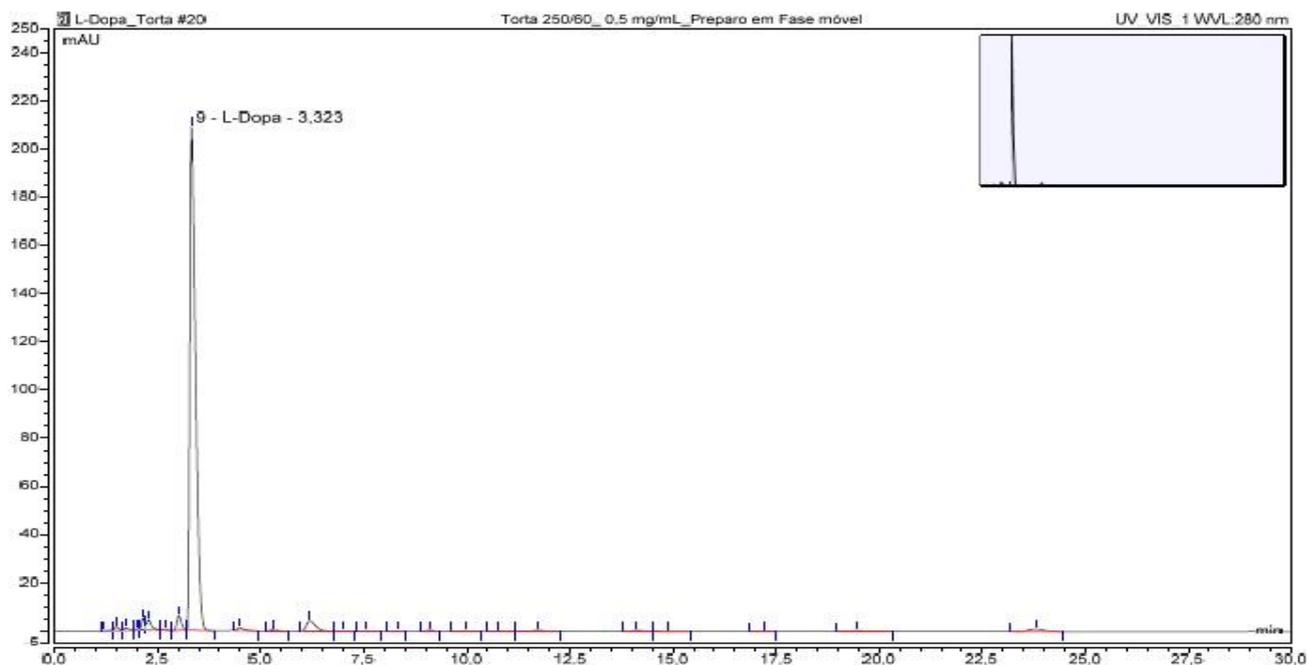
Figura 14: Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 150 bar.



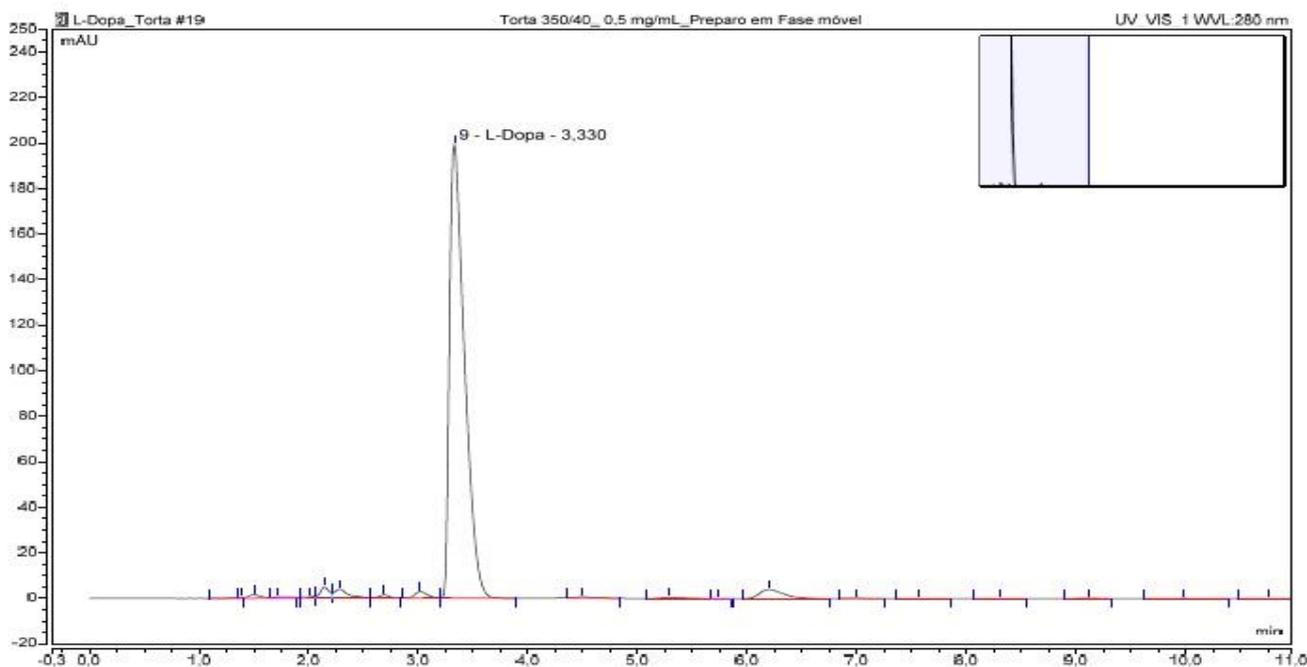
**Figura 15:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 150 bar.



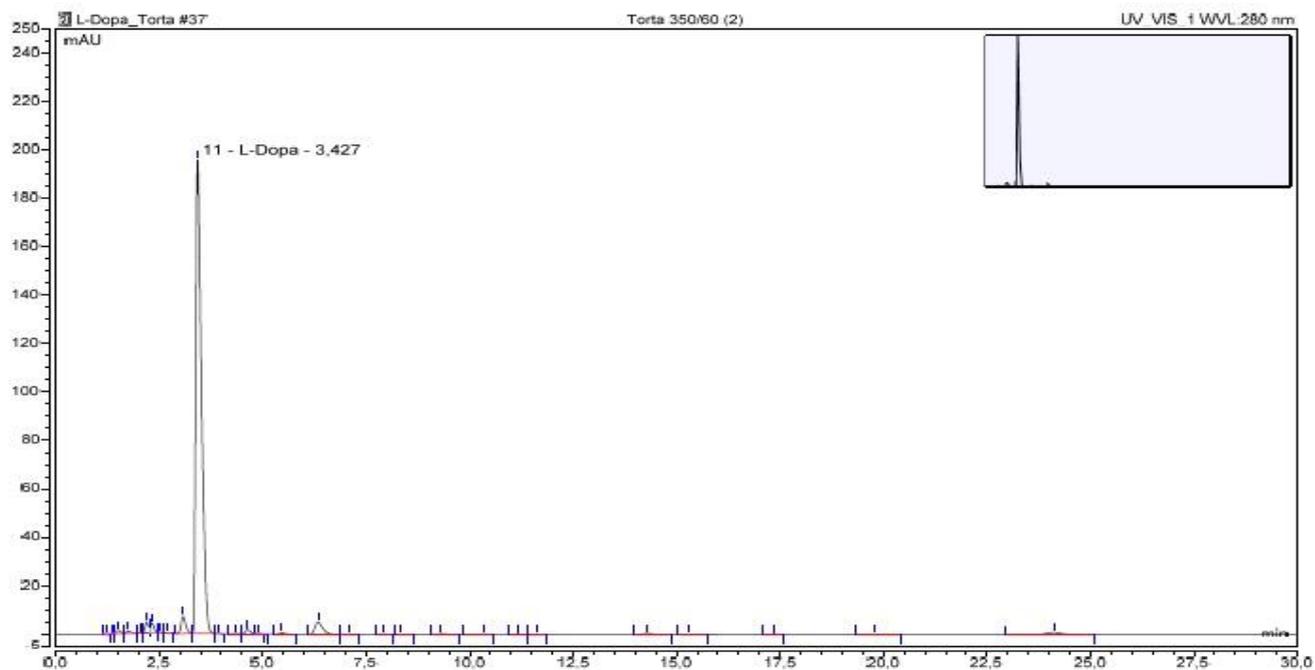
**Figura 16:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 250 bar.



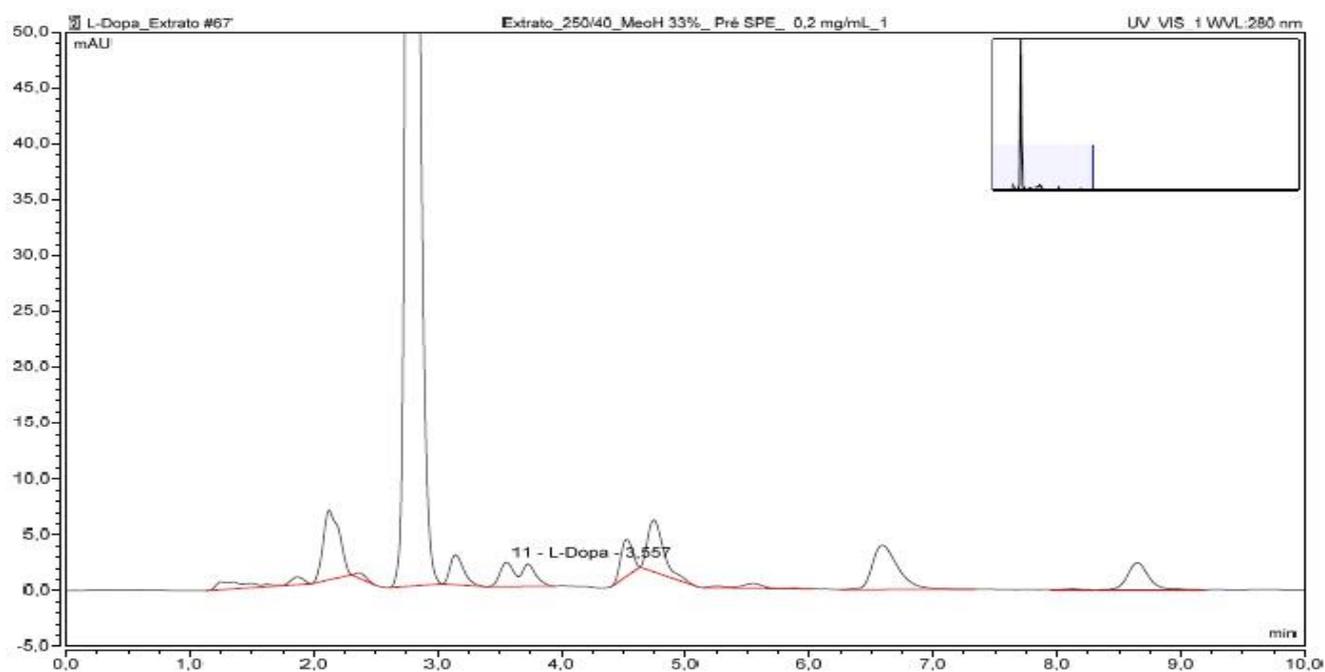
**Figura 17:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 250 bar.



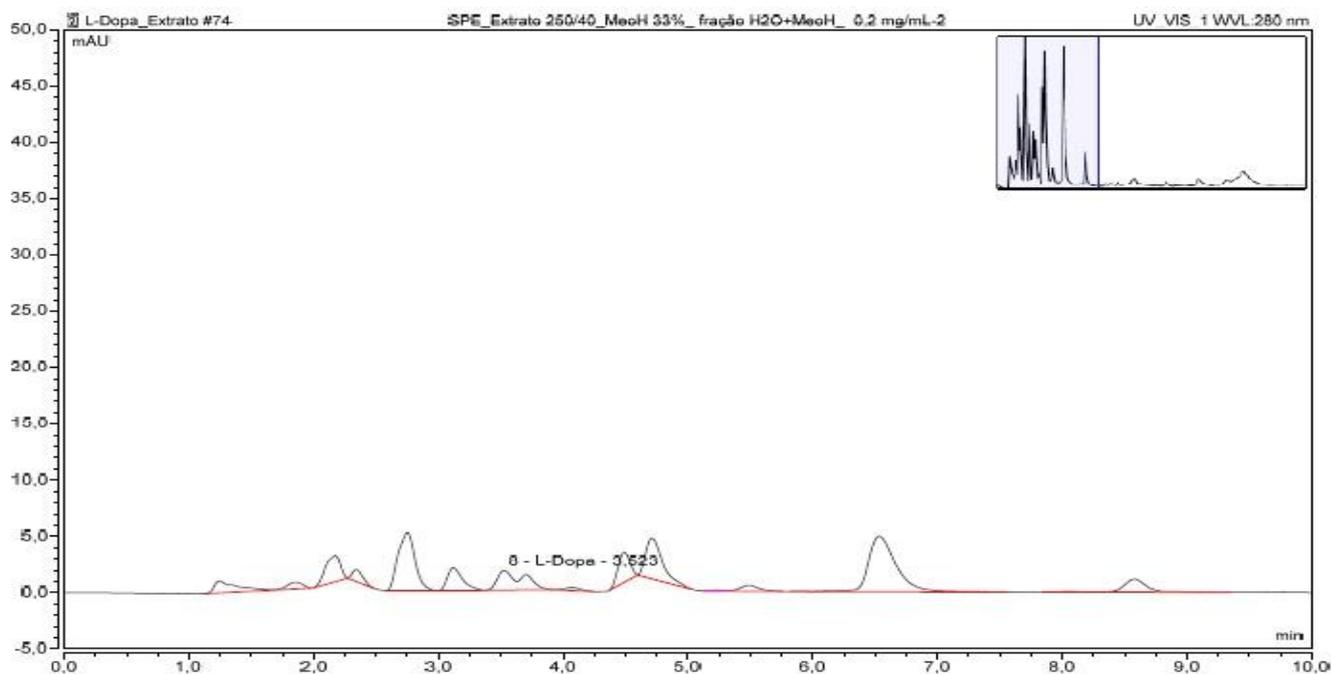
**Figura 18:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 40°C e 350 bar.



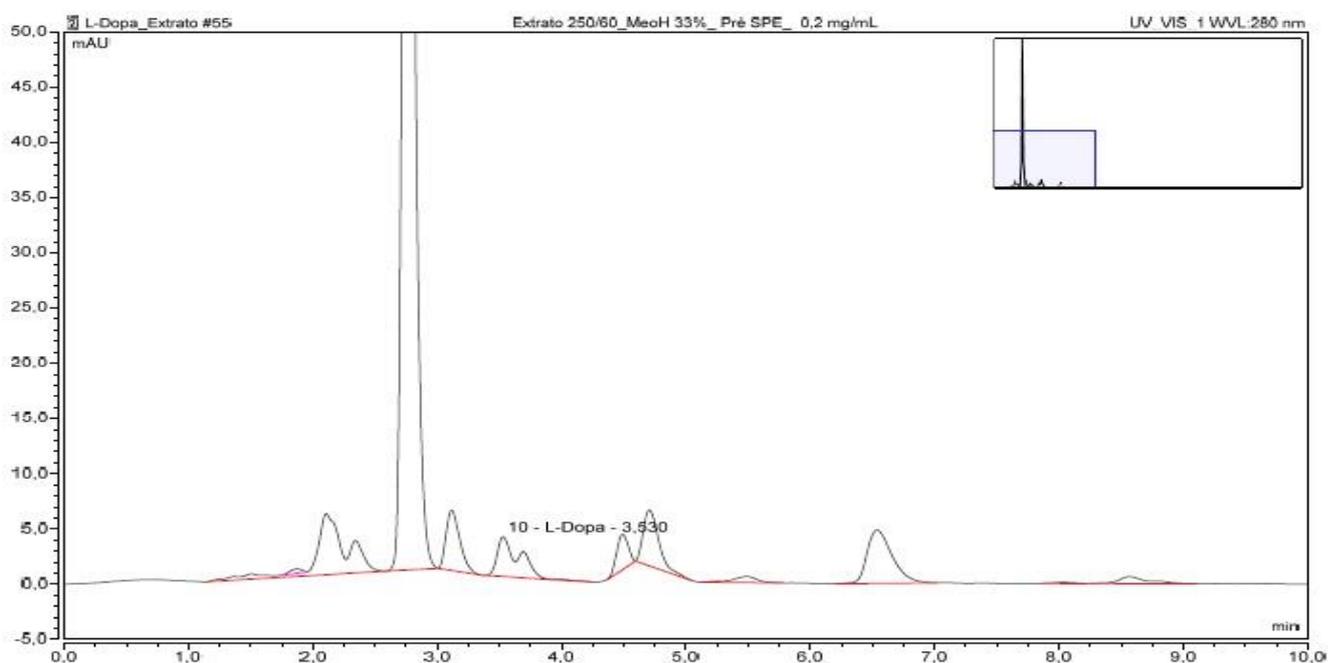
**Figura 19:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa na torta pós-extração condição de 60°C e 350 bar.



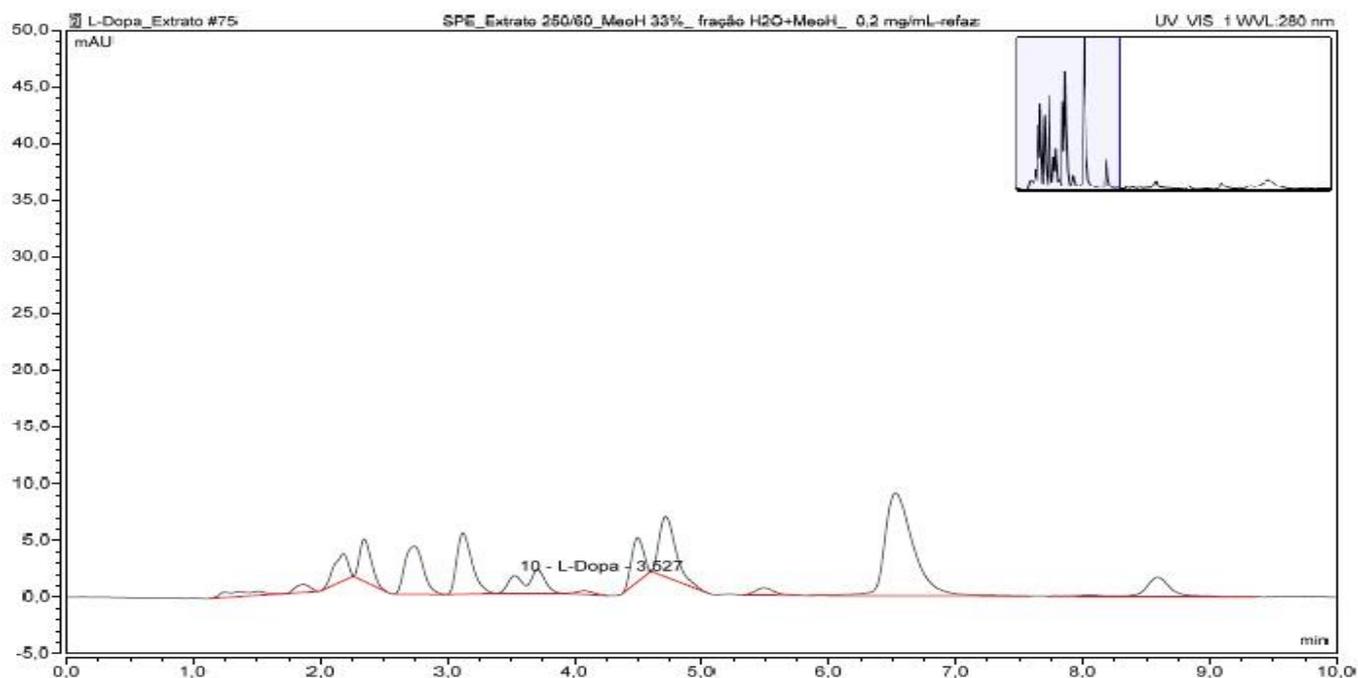
**Figura 20:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 250 bar – fase amostra.



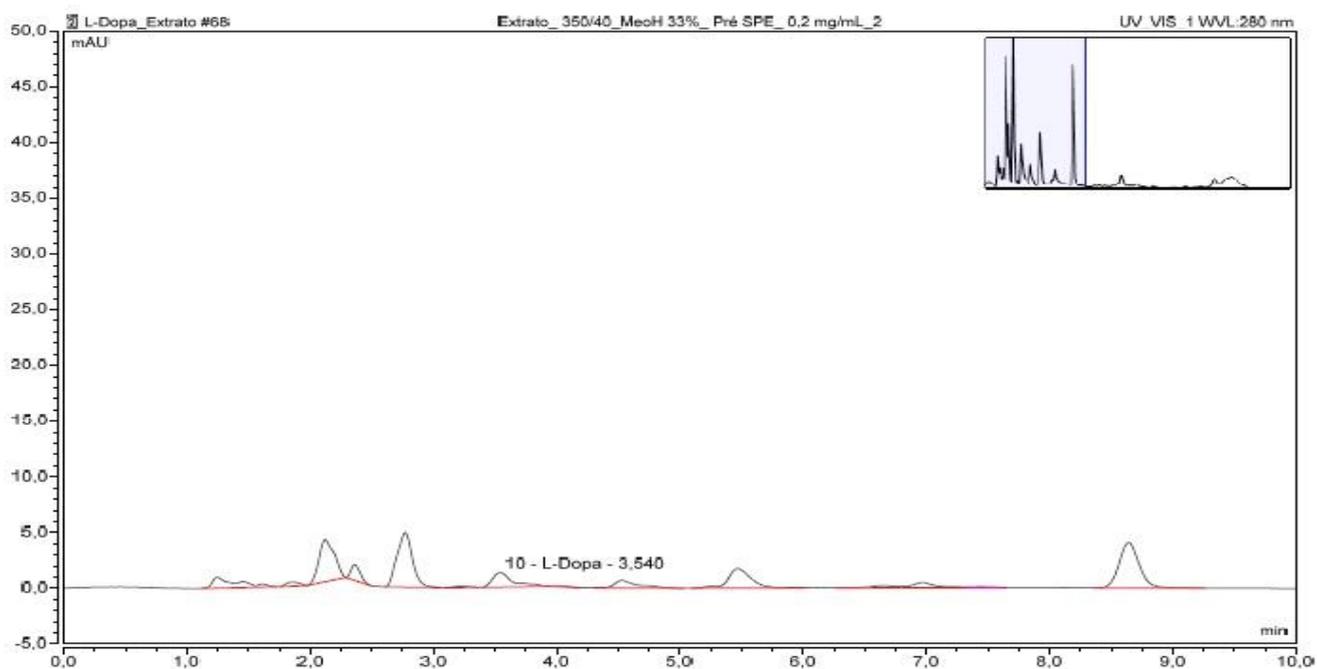
**Figura 21:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 250 bar – fase água + metanol.



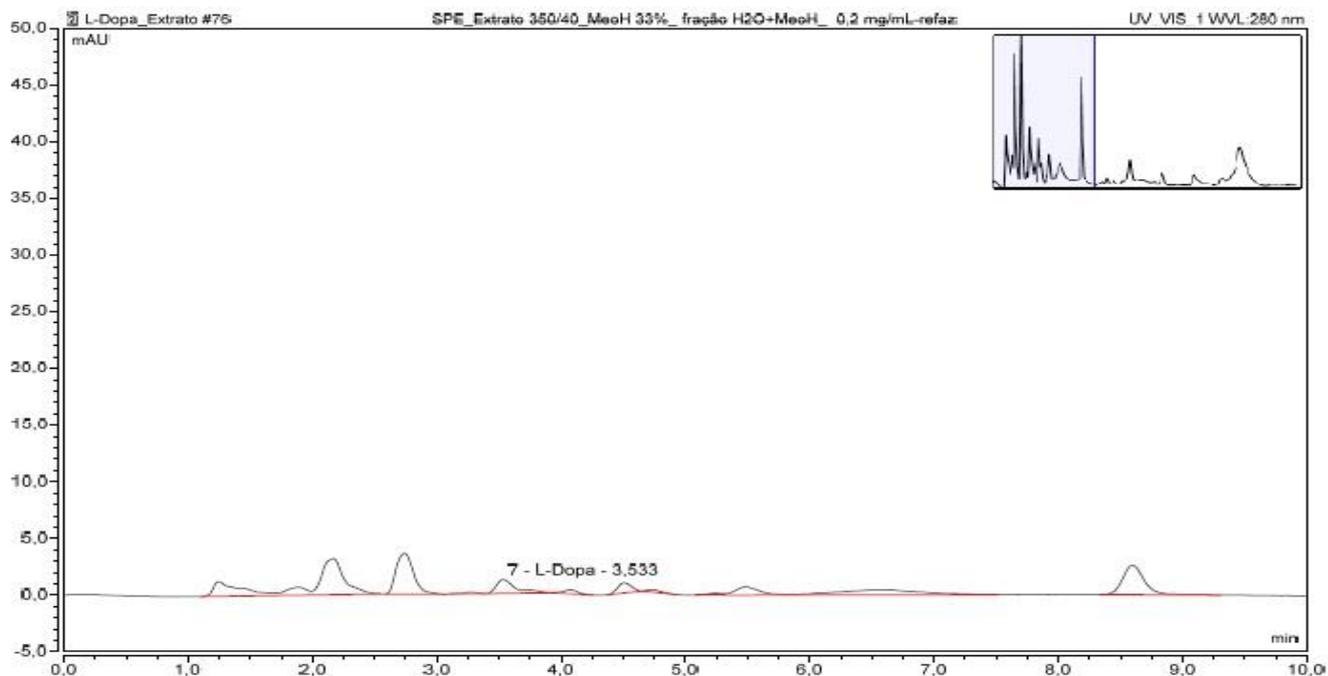
**Figura 22:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 250 bar – fase amostra.



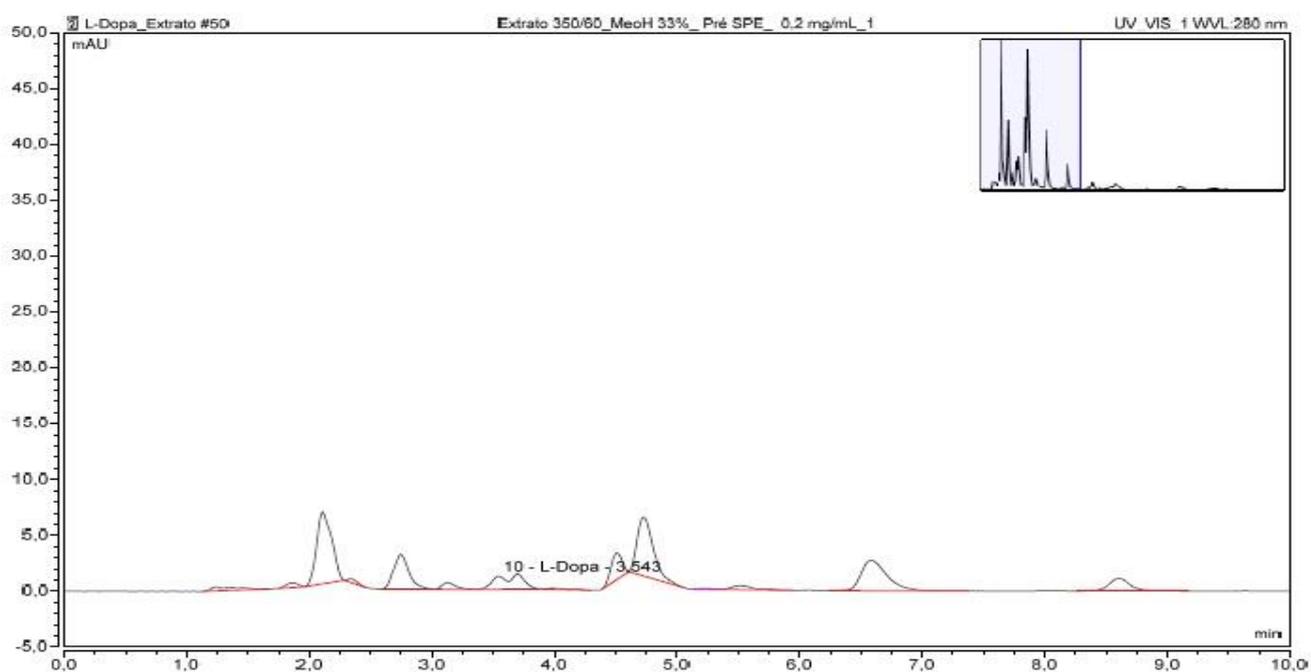
**Figura 23:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 250 bar – fase água + metanol.



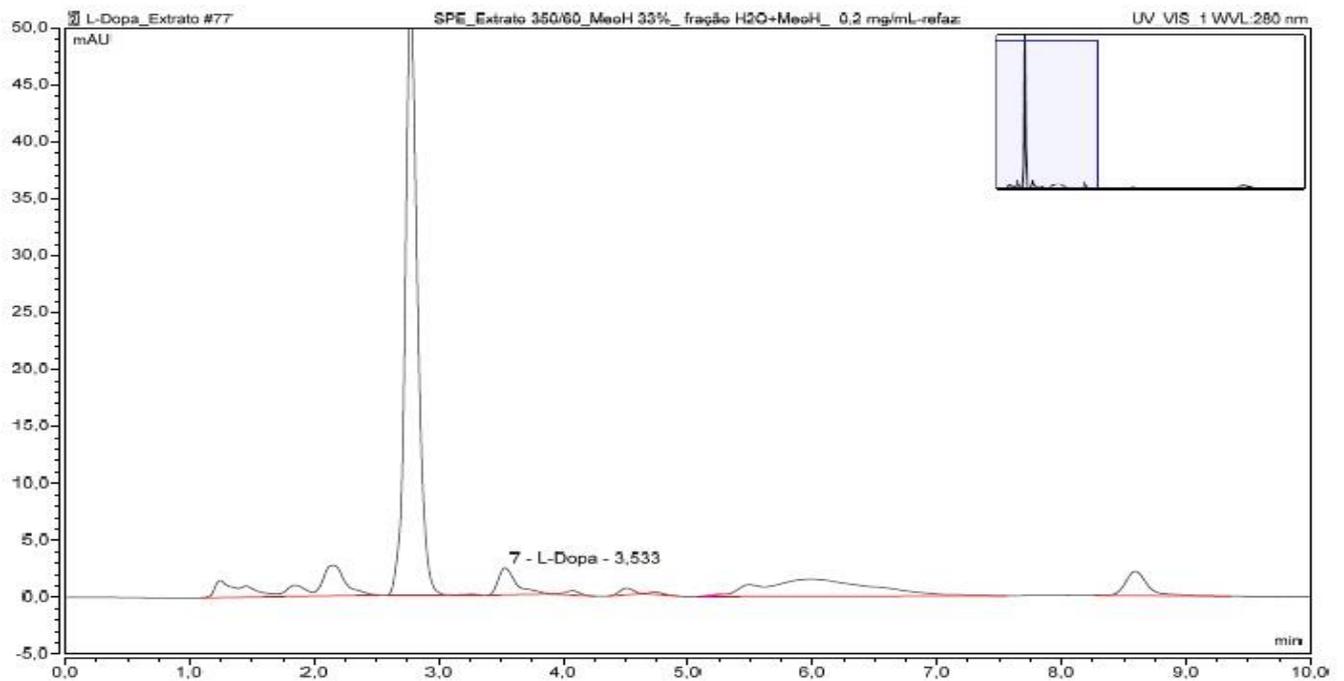
**Figura 24:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 350 bar – fase amostra.



**Figura 25:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 40°C e 350 bar – fase água + metanol.



**Figura 26:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 350 bar – fase amostra.



**Figura 27:** Cromatograma quantificação do composto L-dopa no extrato condição de 60°C e 350 bar – fase água + metanol.