

BRUNA TOLENTINO SILVA

**EXTRAÇÃO DE *L*-DOPA DE SEMENTES DE MUCUNA COM SOLVENTES
EUTÉTICOS PROFUNDOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

BRUNA TOLENTINO SILVA

**EXTRAÇÃO DE *L*-DOPA DE SEMENTES DE MUCUNA COM SOLVENTES
EUTÉTICOS PROFUNDOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Antonio Jacinto Demuner

Coorientadora: Rita de Cássia S. de Souza

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586e
2020 Silva, Bruna Tolentino, 1991-
Extração de *L*-dopa de sementes de mucuna com solventes
eutéticos profundos e avaliação do potencial biológico / Bruna
Tolentino Silva. – Viçosa, MG, 2020.
79 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.65-75.

1. Levodopa. 2. Solventes. 3. Doença de Parkinson.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 583.74

BRUNA TOLENTINO SILVA

**EXTRAÇÃO DE L-DOPA DE SEMENTES DE MUCUNA COM SOLVENTES
EUTÉTICOS PROFUNDOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2020

Assentimento:



Bruna Tolentino Silva
Autora



Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

*Dedico este trabalho aos portadores de
Mal de Parkinson, à indústria química,
à família, aos amigos,
e
à sociedade médica e científica.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus e a todos que Ele utilizou como meio de auxílio nesta grande caminhada. Agradeço aos meus familiares e amigos por terem me dado suporte emocional para concluir esta grande jornada de sucesso. Um agradecimento especial ao meu orientador Antônio Jacinto Demuner e ao professor Tiago do departamento de bioquímica por terem me dado suporte e condições para realizar os experimentos e alcançarmos resultados de excelência. A professora e coorientadora Rita, por ter confiado em mim para que eu iniciasse as pesquisas dessa área. Aos alunos do LASA pela amizade e auxílio nas atividades de laboratório. Obrigada Zé Luís pelas leituras realizadas no HPLC. Este trabalho, bem como a minha graduação inteira, devo graças a minha mãe Renata que me proporcionou minha estadia em Viçosa, bem como acompanhou minhas lutas, meus desesperos e minhas vitórias durante todo o mestrado. Obrigada por sempre ter rezado por mim, junto com minha avó Dirce e minha tia Cláudia. Agradeço aos meus amigos de curso e também aos amigos que encontrei pelos caminhos da graduação e pelas festas de Viçosa, vocês também tiveram papel fundamental no meu crescimento profissional e também como pessoa. Agradeço também aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, FAPEMIG, pela bolsa concedida e auxílios financeiros. Ao DEQ e à UFV, por terem me dado condições para realizar este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Gratidão!

RESUMO

SILVA, Bruna Tolentino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Extração de *L*-dopa de sementes de mucuna com solventes eutéticos profundos e avaliação do potencial biológico.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadora: Rita de Cássia Superbi de Sousa.

A *L*-dopa é um precursor direto da dopamina, cuja deficiência no cérebro, causa o Mal de Parkinson. A principal fonte natural desse composto são as sementes de *Mucuna sp* e na sua extração tradicional, são utilizados solventes orgânicos voláteis e/ou tóxicos. A proposta deste trabalho foi substituir os solventes tradicionais pelos solventes eutéticos profundos (SEP). O SEP se trata de uma mistura de dois ou três compostos: um doador de interações de hidrogênio e um sal de amônio quaternário. É atóxico, de baixo custo, não inflamável, biodegradável e seu preparo é simples. Na primeira fase, as sementes de *Mucuna cinerea* e *M. pruriens* foram preparadas para os métodos de extração. No segundo passo, foram realizados três métodos de extração: aquecimento com agitação, ultrassom e micro-ondas, utilizando solventes como água, etanol e também os SEP à base de cloreto de colina com os compostos ácido cítrico, ureia ou glicerol. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência que confirmou a eficiência do SEP em extrair *L*-dopa presente nas sementes. Ao utilizar uma solução com 30% de SEP foi possível obter 7,25% de *L*-dopa, na extração em ultrassom com SEP-glicerol. Na literatura, os relatos são de que as sementes de *Mucuna sp* apresentam de 4 a 6% de *L*-dopa e o maior teor obtido do composto, através de solventes tradicionais, foi em torno de 2%. Na terceira etapa, foi realizado um planejamento estatístico para a determinação do ponto ótimo de extração de *L*-dopa presente na semente. Na última etapa foi avaliado o potencial dos extratos de *L*-dopa em SEP, com relação a indução de resposta celular e atividade antioxidante desses extratos. Observou-se que tempo e temperatura, quando combinados, podem aumentar a eficiência de extração com os SEP em relação com os ensaios de indução celular foram positivos para os extratos, demonstrando a sinergia entre *L*-dopa e os SEP. O potencial antioxidante da *L*-dopa foi confirmado. O método de extração por SEP é, portanto, promissor e inédito, confirmando o seu possível uso na substituição de solventes caros e poluentes.

Palavras-chave: *L*-dopa. Solventes eutéticos profundos. Mal de Parkinson.

ABSTRACT

SILVA, Bruna Tolentino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. ***L-dopa extraction from mucuna seed with deep eutectic solvents and evaluation of biological potential.*** Advisor: Antonio Jacinto Demuner. Co-advisor: Rita de Cássia Superbi de Sousa.

L-dopa is a direct precursor to dopamine, whose deficiency in the brain causes Parkinson's disease. The main natural source of this compound is the seeds of *Mucuna* species and in its traditional extraction, volatile and / or toxic organic solvents are used. The purpose of this work was to replace traditional solvents with deep eutectic solvents (SEP). SEP is a mixture of two or three compounds: a donor of hydrogen interactions and a quaternary ammonium salt. It is non-toxic, low cost, non-flammable, biodegradable and its preparation is simple. In the first phase, the seeds of *Mucuna cinerea* and *M. pruriens* were prepared for the extraction methods. In the second step, three extraction methods were performed: heating with agitation, ultrasound and microwave, using solvents such as water, ethanol and also the choline chloride-based SEP with the compounds citric acid, urea or glycerol. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography which confirmed the efficiency of SEP in extracting *L-dopa* present in the seeds. When using a solution with 30% of SEP it was possible to obtain 7.25% of *L-dopa*, in the extraction in ultrasound with SEP-glycerol. In the literature, the reports are that the seeds of *Mucuna sp* have from 4 to 6% of *L-dopa* and the highest content obtained from the compound, through traditional solvents, was around 2%. In the third stage, statistical planning was carried out to determine the optimal point of extraction of *L-dopa* present in the seed. In the last step, the potential of *L-dopa* extracts in SEP was evaluated, in relation to the induction of cellular response and antioxidant activity of these extracts. It was observed that time and temperature, when combined, can increase the extraction efficiency with the SEP in relation to the cell induction tests were positive for the extracts, demonstrating the synergy between *L-dopa* and the SEP. The antioxidant potential of *L-dopa* has been confirmed. The SEP extraction method is therefore promising and unprecedented, confirming its possible use in the replacement of expensive and polluting solvents.

Keywords: *L-dopa*. Deep eutectic solvents. Parkinson's disease.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Revisão Bibliográfica	12
2.1 <i>L</i> -dopa.....	12
2.2 Mal de Parkinson	13
2.3 Propriedade Antioxidante	15
2.4 Solvente Eutético Profundo	15
3 Objetivo Geral.....	18
3.1 Objetivos específicos.....	18
4 Material e Métodos	18
4.1 Preparação das sementes	19
4.2 Separação e Análise Granulométrica	20
4.3 Preparo dos SEP.....	21
4.4 Métodos analíticos	22
4.4.1 Determinação das curvas padrão da <i>L</i> -dopa	23
4.5 Extração da <i>L</i> -dopa	23
4.5.1 Determinação do tipo de semente com maior concentração de <i>L</i> -dopa.....	23
4.5.2 Determinação da granulometria ideal da semente moída para extração	24
4.5.3 Determinação do melhor método e solvente de extração da <i>L</i> -dopa	24
4.5.3.1 O método de extração por aquecimento e agitação magnética	25
4.5.3.2 O método de extração em Ultrassom	25
4.5.3.3 O método de extração em Micro-ondas.....	26
4.6 Otimização do procedimento de extração	26
4.6.1 Planejamento Fatorial Completo 2 ³	26
4.6.2 Caminho de ascensão ao máximo	26
4.6.3 Planejamento Fatorial Composto Central.....	27
4.7 Determinação quantitativa dos componentes nos extratos liofilizados.....	28
4.7.1 Relação massa/massa extratos e <i>L</i> -dopa.....	28
4.8 Atividade Antioxidante	28
4.9 Ensaio biológicos de indução celular provocado pelos extratos	29
4.9.1 Eficiência da <i>L</i> -dopa em extrato para o tratamento de Mal de Parkinson.....	29
4.9.2 Estudo da citotoxicidade dos compostos testados.....	30

4.9.3 Extração de RNA total e Síntese de cDNA	32
4.9.4 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real.....	33
5 Resultados e Discussão.....	34
5.1 Efeito do tipo de semente de <i>Mucuna</i> na extração de <i>L</i> -dopa	34
5.2 Análise Granulométrica.....	35
5.3 Determinação da granulometria ideal da semente moída para extração	37
5.4 Determinação do melhor método e solvente de extração.....	37
5.4.1 O método de extração por aquecimento e agitação.....	37
5.4.3 O método de extração em Micro-ondas.....	39
5.5 Planejamento Fatorial Completo 2 ³	43
5.5.1 Planejamento Fatorial Completo 2 ³ para o SEP-glicerol	44
5.5.2 Planejamento Fatorial Completo 2 ³ para o SEP-ácido cítrico	45
5.5.3 Planejamento fatorial completo 2 ³ para o SEP-ureia	46
5.5.2 Caminho de ascensão ao máximo	47
5.5.2.1 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-glicerol	47
5.5.2.2 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-ácido cítrico	48
5.5.2.3 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-ureia	48
5.5.3 Planejamento fatorial composto central	49
5.5.3.1 Planejamento fatorial composto central para o SEP-glicerol	49
5.5.3.2 Planejamento fatorial composto central para o SEP-ácido cítrico	52
5.5.3.3 Planejamento fatorial composto central para o SEP-ureia	54
5.6 Ensaio Biológicos	56
5.6.1 Teste antioxidante	56
5.6.2 Eficiência do padrão de <i>L</i> -dopa e dos extratos de <i>L</i> -dopa em SEP.....	59
5.6.2.1 Análise de proliferação em células HEK-293.....	59
5.6.2.2 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real.....	62
6 Considerações Finais.....	64
7 Referências	65
Anexos	76
A8.1. Curvas padrão de <i>L</i> -dopa	76
A8.1.1 Primeira curva padrão de <i>L</i> -dopa	76
A8.1.2 Segunda curva padrão da <i>L</i> -dopa	76
A8.1.3 Terceira curva padrão da <i>L</i> -dopa.....	77

A8.2. Ensaio biológico.....	77
A8.2.1. Absorbâncias obtidas	77
A8.2.2 Teste Proliferação celular em contato com <i>L</i> -dopa e seus extratos.....	78
A8.2.3 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real.....	78

1 Introdução

A *L*-dopa (levodopa) é um precursor direto da dopamina extraída das sementes de *Mucuna sp* (Leguminosae) de origem asiática conhecida como feijão de veludo (MULYONO, 2013) e pó de mico no Brasil. O composto foi isolado pela primeira vez das sementes de *Mucuna pruriens* (Figura 1) em 1937 (DAMODARAN e RAMASWAMY, 1937, citado por KATZENSHLAGER et al., 2004). Quando o valor deste composto para o tratamento da doença de Parkinson se tornou conhecido, um grande interesse científico em plantas ricas em levodopa foi revivido (KATZENSHLAGER et al., 2004). Em uma pesquisa conduzida por MISRA et al. (2007), o extrato de *n*-propanol com *L*-dopa mostrou atividade neuroprotetiva significativa o que explica o fato da substância ser usada há muito tempo na medicina indígena Ayurvédica, no tratamento de doenças incluindo o mal de Parkinson (MULYONO et al., 2013).

Figura 1 – Frutos e sementes de *Mucuna pruriens*.



Fonte: www.portaldoholanda.com.br

O Mal de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva, relacionada a anormalidades cerebrais, que tem como sintomas: tremor em repouso, rigidez, marcha e mudança de posturas. Este distúrbio é parcialmente definido pela diminuição da produção de dopamina (KATZENSHLAGER et al., 2004). No entanto, a dopamina não pode ser efetivamente utilizada para o tratamento da doença pois não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (HU et al., 2010). Ao contrário da dopamina, a *L*-dopa pode atravessar essa barreira atingindo o sistema nervoso central, onde é convertida em dopamina (MU et al., 2015; ZHANG et al., 2001).

A administração de *L*-dopa sintética causa efeitos colaterais, como a discinesia (movimento muscular involuntário induzido por drogas). Em contrapartida, estudos apontam

que em modelos animais, a *L*-dopa naturalmente extraída de mucuna produz melhores resultados do que sua contraparte sintética (JOHNSON et al., 2018). No geral, a maioria desses estudos abordou o uso de solventes orgânicos voláteis tanto nos procedimentos de extração quanto de separação.

Os métodos tradicionais de extração envolvem o uso de solventes convencionais que em sua grande parte são voláteis, tóxicos e demanda grande tempo de extração e tratamento adicional, além da demanda por grandes volumes de solventes para sucessivas extrações (HALIM et al., 2012).

Uma nova categoria de solventes biodegradáveis foi descoberta em 2002 por ABBOTT e seus colaboradores (2002) como uma nova alternativa ecologicamente correta e recebeu o nome de solventes eutéticos profundos (SEP). Os SEP possuem em sua composição um sal orgânico (tal como cloreto de colina ou acetato de colina) e um composto capaz de realizar interação de hidrogênio (tais como amidas, aminas, álcoois e ácidos carboxílicos). A mistura destes compostos causa a diminuição da entropia associada às transições de fase e, conseqüentemente, uma redução significativa da temperatura de fusão da mistura, quando comparada com as temperaturas de fusão dos dois constituintes separados. Diante da queda abrupta da temperatura de fusão de mistura é possível obter SEP que sejam líquidos a temperaturas inferiores à temperatura ambiente (SMITH et al., 2014).

Os SEP's oferecem vários benefícios importantes, como preparação simples, baixo custo, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (ABBOTT et al., 2002, RADOSEVIC et al., 2015, ZHANG et al., 2012). Além disso, em sistemas biológicos possuem funções de armazenamento e proteção de metabólitos e em alguns organismos, também tem função de protetor celular em condições extremas, como falta de água ou baixas temperaturas (SAVI, 2019). Sendo assim, os SEP tem despertado grande interesse da comunidade científica e são solventes promissores na contribuição para novos horizontes em bioextração.

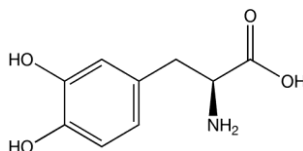
Assim, a proposta deste trabalho foi preparar alguns solventes eutéticos profundos baseados em cloreto de colina e comparar seus potenciais de extração da *L*-dopa presente nas sementes de *Mucuna cinerea* e *Mucuna pruriens*, perante solventes tradicionais e também atóxicos de forma a se otimizar o rendimento.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 L-dopa

A L-dopa (Figura 2) é uma substância extraída de uma planta leguminosa chamada *Mucuna sp.*, vulgarmente conhecida como Mucuna, feijão de veludo e pó de mico. O gênero *Mucuna* é típico do leste da Índia e regiões ocidentais da China, compreende nove espécies sendo a *Mucuna pruriens* a mais estudada e relatada na literatura (AWARE et al., 2017, MULYONO et al., 2013; JOHNSON et al., 2018; PARMEZAN et al., 2017). A planta é um arbusto com ramos longos (tipo cipó) de até 15 m de comprimento. Quando jovem, apresenta-se completamente coberta por pelos e quando mais velha, já não os possui mais (MULYONO et al., 2013). É conhecida pela medicina popular nos tratamentos de impotência sexual masculina, tônico para o sistema nervoso e também como afrodisíaco (MISRA e WAGNER, 2007). A planta possui inúmeros compostos fitoquímicos, como alcaloides, compostos fenólicos e saponinas (DUANGNIN et al., 2017). E apesar de ser um tipo de feijão, seu consumo para humanos pode causar distúrbios gastrointestinais e lesões cutâneas (HUISDEN et al., 2019).

Figura 2 - Fórmula estrutural da L-dopa.



Fonte: Autora (Programa ChemDraw Ultra 12.0)

As sementes de *Mucuna* apresentam alta concentração de L-dopa (de 4 a 6%), um precursor direto do neurotransmissor dopamina (CASSANI et al., 2016). O extrato alcoólico da L-dopa com propanol mostrou atividade neuroprotetiva significativa (MISRA e WAGNER, 2007; JOHNSON et al., 2018), o que explica o fato da substância ser usada há muito tempo na medicina indígena Ayurvédica, o sistema tradicional indiano de medicina, no tratamento de doenças, incluindo o mal de Parkinson (MULYONO et al., 2013; JOHNSON et al., 2018). A acidificação da solução para pH 3 permite a extração da L-dopa presente nas sementes de *Mucuna*, com tamanho de partícula próximos de 1 mm em aproximadamente 8 horas (HUISDEN et al., 2019).

A *L*-dopa também é um inibidor natural da prolactina e eficaz no tratamento da hiperprolactinemia. Uma das vantagens de se utilizar compostos medicinais presentes em plantas é o fato de causarem efeitos colaterais bem menores que os sintéticos, menor indução de quimiorresistência e também o fato da maior disponibilidade e renovação do recurso sem agressão ao meio ambiente (SINHA et al., 2018).

O extrato de sementes de *Mucuna pruriens* também causou a redução de níveis séricos de glicose em ratos diabéticos e uma melhora no comportamento sexual dos mesmos resultados estes que foram atribuídos à presença de *L*-dopa (DUANGNIN et al., 2017).

A *L*-dopa natural foi primeiramente isolada de sementes de *Mucuna pruriens* em 1937 (DAMODARAN e RAMASWAMV, 1937, citado por KATZENSCHLAGER et al., 2004). Quando o valor deste composto para o tratamento da doença de Parkinson se tornou conhecido, um grande interesse científico em plantas ricas em *L*-dopa foi revivido (KATZENSCHLAGER et al., 2004). Foi observado que, em modelos de roedores, a *L*-dopa naturalmente extraída, aumentou a atividade mitocondrial do cérebro e surtiu melhores resultados do que a sintética (LIEU et al., 2012; JOHNSON et al., 2018). Em uma pesquisa, MISRA e WAGNER (2007) estudaram a extração de *L*-dopa de sementes de *Mucuna* usando diferentes solventes. Foi obtido um bom rendimento de extração utilizando uma mistura de etanol-água (1:1), utilizando ácido ascórbico como protetor, um antioxidante que impede a oxidação dos constituintes das sementes e por sua vez, a degradação dos mesmos.

Em todos os estudos de quantificação de *L*-dopa relatados na literatura, os procedimentos de extração foram longos, exaustivos e realizados em várias etapas (MOHAPATRA et al., 2020).

2.2 Mal de Parkinson

O mal de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva, relacionado a anormalidades cerebrais, caracterizada pela degeneração ou perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra cerebral, causando a diminuição de dopamina no cérebro. Os principais fatores que influenciam o aparecimento da doença é a deficiência neurológica para a produção de dopamina em áreas cerebrais relacionadas com o movimento voluntário. A queda de produção da dopamina pode ocorrer devido a idade avançada, fatores genéticos, exposição excessiva a pesticidas e toxinas. Estudos em modelos animais de cultura celular e tecido cerebral pós morte e investigações na genética humana, demonstram também a contribuição do estresse oxidativo e disfunções mitocondriais no surgimento da doença

(AWARE, 2017). Observou-se também, que a suplementação de substâncias potencialmente antioxidantes, como fenólicos, flavonoides e alcaloides, reduzem o estresse oxidativo nas células (AWARE, 2017).

A doença atinge 1-2% da população acima dos 50 anos e acredita-se que seja causada por fatores ambientais e genéticos (JOHNSON et al., 2018; FERNANDES et al., 2018; SAMPAIO, 2018; SARDJONO et al., 2018). A catalepsia é o sintoma mais comum e característico da doença e se trata de um distúrbio do sistema nervoso central que causa a rigidez muscular, postura imóvel e diminuição da sensibilidade à dor (SARDJONO et al., 2018). Outros sintomas da doença é o tremor em repouso, distúrbios da marcha (fator debilitador, pois predispõe o doente a quedas), instabilidade postural, redução do comprimento do passo (PELICIONI et al., 2018).

A dopamina é uma catecolamina e um neurotransmissor sintetizado por células nervosas que agem em regiões do cérebro promovendo entre outros efeitos, a sensação de prazer e de motivação (ANDREU et al., 1999). Este neurotransmissor não pode ser efetivamente utilizado para o tratamento da doença porque não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (HU et al., 2010). A solução encontrada foi utilizar um precursor da dopamina: a *L*-dopa. Essa substância passa por uma reação da enzima dopa-descarboxilase, na qual é convertida em dopamina. Sendo assim, compensada sua deficiência no organismo penetrando facilmente a barreira da corrente sanguínea (BERGAMINI et al., 2005).

O principal tratamento para o mal de Parkinson envolve a administração de *L*-dopa sintética. Ela fornece um controle rápido e efetivo dos sintomas do sistema motor para praticamente todos os pacientes (MARTINS et al., 2013). Ao ser administrada via oral, a *L*-dopa sofre rápido metabolismo pela enzima *L*-aminoácido aromática descarboxilase (AADC) e pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT), o que contribui para a travessia da barreira hematoencefálica (FERNANDES et al., 2018) podendo causar discinesia (movimento muscular involuntário induzido por drogas) quando se usa *L*-dopa sintética.

Em se tratando de fonte natural de *L*-dopa a semente de *Mucuna* é a mais popular e oferece como vantagem a presença de outros metabólitos como fenólicos, alcaloides e flavonoides, que podem auxiliar no tratamento desta doença através de outras vias (AWARE, 2017).

Já o uso do medicamento à base de *L*-dopa produzida sinteticamente pode causar em longo prazo a imunodeficiência e doenças gastrointestinais, além dos efeitos colaterais provocados pelo medicamento já nas primeiras posologias (AWARE, 2017).

Estudos preliminares realizados em primatas e humanos portadores da doença sugerem que o extrato de *Mucuna pruriens* pode ser usado para a melhoria dos sintomas motores causados pelo Mal de Parkinson com perfil farmacocinético favorável sendo um possível tratamento com menores efeitos colaterais, como as discinesias (CASSANI et al., 2016).

2.3 Propriedade Antioxidante

Os compostos chamados antioxidantes podem reduzir o dano oxidativo nas células através de reações com radicais livres inibindo a atividade ou expressão de enzimas geradoras de radicais livres, ou até mesmo afetando a atividade de enzimas antioxidantes intracelulares. Os antioxidantes são moléculas capazes de neutralizar os radicais livres, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição de não emparelhamento do radical. Tais moléculas podem reagir diretamente com os radicais reativos e destruí-los, tornando-se novos radicais livres menos ativos, com vida longa e menos perigosos que os radicais neutralizados (LU et al., 2010).

Para a indústria de alimentos, os antioxidantes naturais são os mais seguros em termos de toxicidade, além de possuírem também compostos flavonoides, carotenoides e esteroides. Alguns destes antioxidantes podem ajudar na prevenção de estresse oxidativo celulares e também diminuir os riscos de doenças crônicas (LU et al., 2010).

Muitos antioxidantes possuem estruturas aromáticas e são capazes de deslocalizar elétrons desemparelhados, como no caso da *L*-dopa (LU et al., 2010; LOUGHI et al., 2011).

A *L*-dopa é suscetível à degradação oxidativa para formar melanina e outros produtos, como a dopamina (MOHAPATRA et al., 2020). Possui atividade antioxidante até três vezes maior que a vitamina C. Para medir esse tipo de atividade existem vários métodos, de acordo com a substância alvo e expressão dos resultados. Uma substância que atua como antioxidante possui grande importância para área farmacológica, nutrição, alimentícia e fisiológica (LOUGHI et al., 2011). O método utilizado para este trabalho foi o DPPH, devido a confiabilidade dos resultados, facilidade, rapidez e simplicidade.

2.4 Solvente Eutético Profundo

Os métodos tradicionais de extração exigem grandes quantidades de solventes e por consequência seu descarte é muitas vezes de forma inadequada. Além da questão da poluição ambiental, devido a toxicidade de alguns solventes, outro contraponto são os longos períodos

de extração e processos complexos de separação entre o material de interesse e o solvente (MBOUS et al., 2017).

Os solventes orgânicos convencionais, apesar de apresentarem inúmeras vantagens, são voláteis, inflamáveis e explosivos, tóxicos, baixa biodegradabilidade e possuem propriedades carcinogênicas. Além do mais, existe o risco potencial de desastres industriais. No conceito de conscientização ambiental, a química verde tem como objetivo a busca por métodos alternativos que reduzem ou substituem o uso de produtos químicos nocivos em qualquer estágio de produção na indústria ou laboratório (KHANDELWAL et al., 2016). Nos últimos anos, o solvente eutético profundo (um novo tipo de solvente verde e eficiente) tem sido utilizado na substituição dos solventes convencionais em vários tipos de técnicas e mostrou-se eficaz na extração de compostos bioativos e fenólicos (HU et al., 2019; SHAFIE et al., 2020).

O primeiro relato sobre os solventes eutéticos profundos (SEP), ocorreu em 2001 por Abbott e colaboradores (2001) em um estudo sobre líquidos iônicos formados a partir de sais de amônio quaternário aquecidos com ZnCl_2 . Abbott e seus colaboradores observaram que as temperaturas de fusão mais baixas, foram obtidos quando o cloreto de colina foi utilizado como sal de amônio. Este estudo inicial foi ampliado e uma variedade de misturas eutéticas foram produzidas a partir de cloreto de colina e compostos capazes de realizar interação de hidrogênio com o sal de amônio. Esses líquidos foram denominados solventes eutéticos profundos (SEP) para diferenciá-los de líquidos iônicos. Esta mistura se forma através da diminuição da energia de rede e por consequência, a diminuição do ponto de congelamento do sistema, o que justifica, sua fase líquida à temperatura ambiente (ABBOTT et al., 2001; ABBOTT et al., 2002; SMITH et al., 2014).

O foco das misturas eutéticas foi a partir da formação a partir de cloreto de colina e o primeiro solvente eutético formado foi a base de ureia, cuja temperatura de fusão ocorre a 12 °C (ABBOTT et al., 2002).

Os solventes eutéticos profundos (SEP) tem sido amplamente reconhecidos como substitutos mais adequados à Química Verde quando comparados aos solventes convencionais (ALANÓN et al., 2018). São muito utilizados nos campos de nanotecnologia, reações enzimáticas, biocatálise, eletroquímica, farmacêutico, síntese e processos de engenharia (FERREIRA et al., 2020; HAN et al., 2020; ALANÓN et al., 2018). Porém existem poucos relatos em literatura de estudos da aplicação do SEP em extração de compostos bioativos presente em material vegetal (ALANÓN et al., 2018). Apresentam características e propriedades parecidas aos dos líquidos iônicos, e também são uma alternativa verde, mais

econômica e segura para esta categoria de solventes, já que alguns líquidos iônicos são considerados tóxicos (KHANDELWAL et al., 2016).

O SEP é uma categoria de solvente análoga ao líquido iônico (LI), porém este último, apesar de seus benefícios, possui solubilidade limitada, alta viscosidade, alguns são tóxicos e corrosivos, baixa degradabilidade e alto custo de produção (MOGHIMI et al., 2019). A substituição dos líquidos iônicos pelos SEP, foi proposta por MARIA e MAUGERI (2011). A comparação é fácil de ser explicada devido ao fato das propriedades físico-químicas dos SEP serem muito semelhantes às do LI, sendo assim, são considerados uma nova classe de líquidos iônicos. No entanto, o SEP é mais fácil de ser obtido devido ao preço mais acessível e pelo fato de ser mais biodegradável e totalmente verde em todas as etapas de preparação (HU et al., 2019).

SEP é formado através da mistura de ácidos e bases de Lewis ou de Brønsted, que podem conter algumas espécies aniônicas e/ou catiônicas (SMITH et al., 2014). Pode ser então obtido através da complexação de um sal de amônio quaternário com um metal doador de ligação de hidrogênio. A deslocalização da carga que ocorre através da ligação de hidrogênio entre o íon haleto do sal de amônio e o hidrogênio do grupo doador causa a diminuição da faixa de fusão da mistura, em comparação com a faixa de fusão de cada composto separadamente (SMITH et al., 2014). Pode ser produzido através da mistura de dois ou mais componentes, sendo o ponto eutético abaixo da temperatura de fusão de cada componente isolado (ALANÓN et al., 2018).

Os SEP possuem em sua composição um sal orgânico (cloreto de colina ou acetato de colina) e um composto capaz de realizar interação de hidrogênio (tais como amidas, aminas, álcoois e ácidos carboxílicos) que são capazes de se associarem por meio de interações de hidrogênio, na maioria das vezes. Quando esses solventes são formados por metabólitos primários e naturais como aminoácidos, açúcares ou ácidos orgânicos, também são chamados de solventes eutéticos profundos naturais (ALANÓN et al., 2018). A mistura destes compostos origina uma diminuição da entropia associada às transições de fase e, consequentemente, uma diminuição significativa da temperatura de fusão da mistura, quando comparada com as temperaturas de fusão dos dois constituintes separados. Face ao abaixamento abrupto da temperatura de fusão de mistura é possível obter SEP que são líquidos a temperaturas inferiores à temperatura ambiente (SMITH et al., 2014).

Esse tipo de solvente verde apresenta como propriedades e características: fácil preparação, baixa volatilidade, síntese conveniente (economia atômica de 100%), miscibilidade em água, recicláveis, viscosidade ajustável, bom solvente extrator de uma gama

de compostos polares e apolares, orgânicos e inorgânicos, solvente verde e natural, baixo custo, reutilizável, biodegradável, renovável, não tóxico e baixa inflamabilidade (ALANÓN et al., 2018; GOUVEIA et al., 2016; KHANDELWAL et al., 2016; RADOSEVIC et al., 2015). Sua síntese é projetada para a seleção apropriada de componentes individuais em termos de estrutura molecular, natureza química e razão de água. Sendo assim, cada mistura contém sua característica e capacidade única para extrair composto bioativos de plantas (WANG et al., 2018; GOUVEIA et al., 2016; GU et al., 2014). Portanto, na formação dos solventes eutéticos profundos, as interações entre o cloreto de colina e os complementos como ácido cítrico, ureia ou glicerol são do tipo interação de hidrogênio.

3 Objetivo Geral

Extrair *L*-dopa de sementes de *Mucuna* com solventes eutéticos profundos (SEP) e realizar ensaios de potencial biológico.

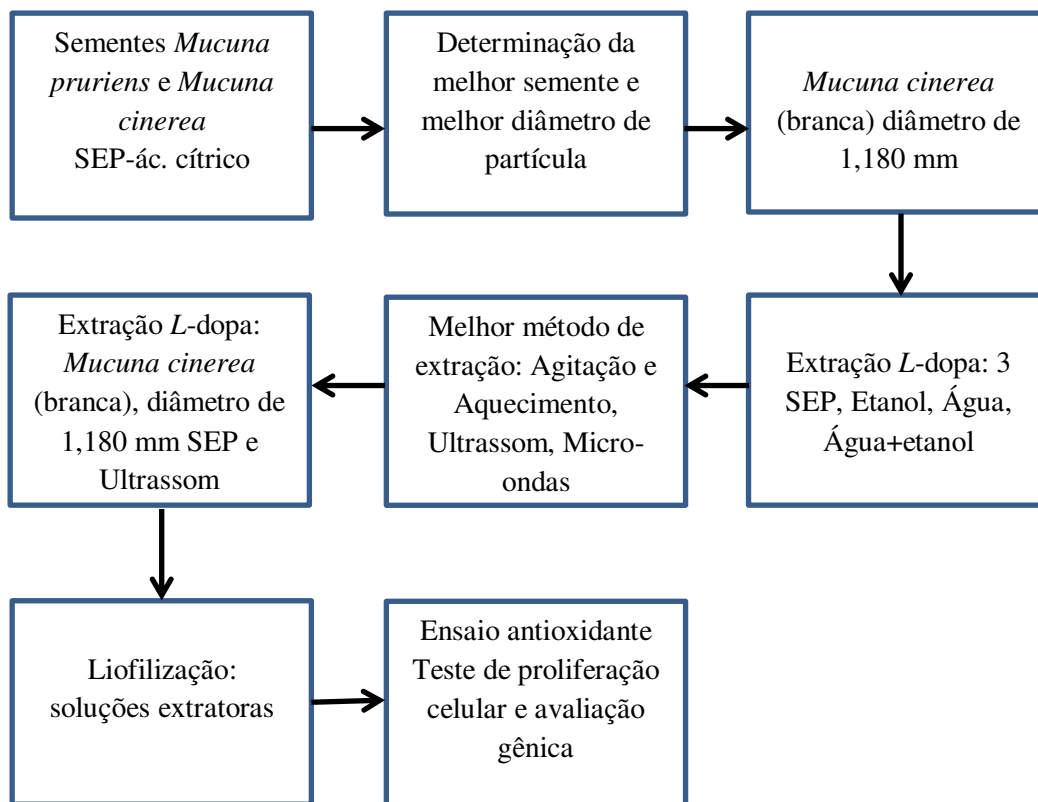
3.1 Objetivos específicos

- Determinar o teor de *L*-dopa em sementes de *Mucuna pruriens* e *Mucuna cinerea*
- Comparar o potencial de extração dos SEP com solventes tradicionais;
- Avaliar o potencial dos SEP na extração da *L*-dopa sob diferentes condições experimentais (tempo, temperatura, concentração de SEP);
- Determinar as condições ótimas de extração de *L*-dopa;
- Realizar ensaios de atividade antioxidante e indução de resposta celular na presença de SEP e *L*-dopa.

4 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos (LASA). Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no Departamento de Biologia e os ensaios de indução celular, no departamento de Bioquímica e Biologia Celular, sob orientação do professor Tiago Mendes. Todos os laboratórios são pertencentes a Universidade Federal de Viçosa. A Figura 3 mostra o Esquema dos experimentos realizados.

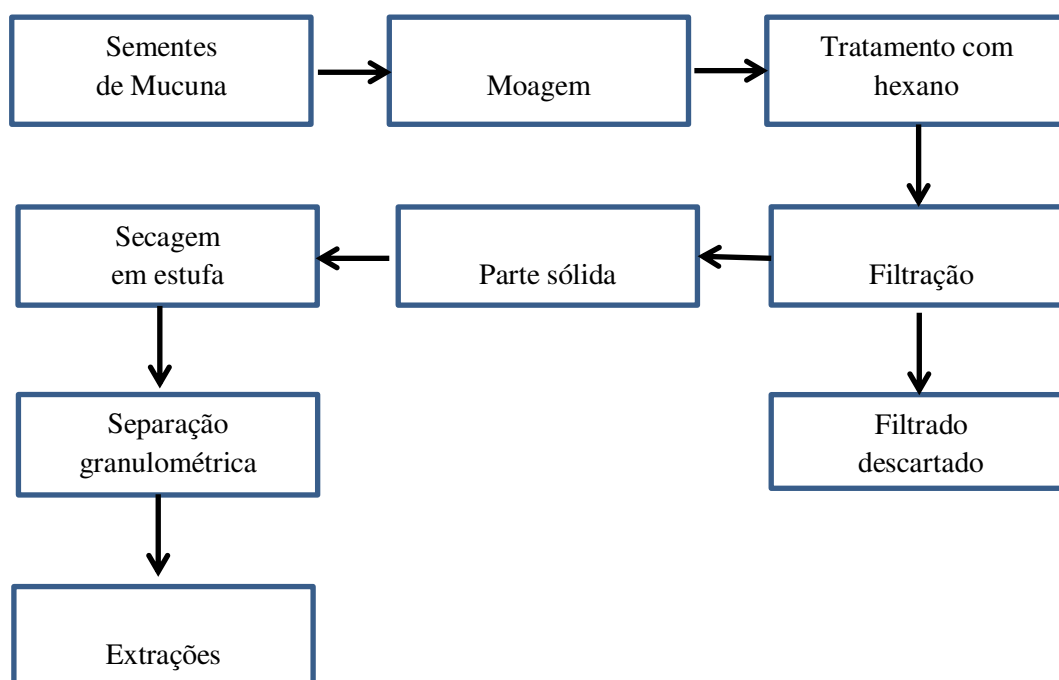
Figura 3 – Fluxograma dos experimentos realizados.



4.1 Preparação das sementes

Neste trabalho, foram utilizados dois tipos de sementes de *Mucuna*: *Mucuna cinerea* (branca) e *Mucuna pruriens* (preta), ambas adquiridas da empresa especializada em comercialização de sementes (BRseeds). As sementes foram desidratadas em estufa por dois dias. Em seguida, as sementes foram moídas em moinho de facas Willye TE-650 e para cada tipo foi realizada a separação granulométrica e determinação do melhor tamanho de partícula para realização de extração. O fluxograma do trabalho inicial está apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Diagrama esquemático de extração da *L*-dopa de sementes de *Mucuna*.



4.2 Separação e Análise Granulométrica

Após a secagem do material sólido foi realizada a separação granulométrica utilizando seis peneiras granulométricas variadas, da marca ASTM da marca Bertel. Cada mesh utilizada equivale a um diâmetro de partícula diferente (Tabela 1):

Tabela 1 - Diâmetro de partícula e sua respectiva mesh de peneira.

Mesh da peneira	Diâmetro de partícula (mm)
Peneira fundo	<0,300
48	0,300
35	0,425
24	0,710
14	1,180
12	1,400

O sistema foi então montado com a sequência de peneiras organizadas sobre o agitador eletromagnético de peneiras granulométricas redondas marca Didática SP. De forma crescente de diâmetro de partícula, ou seja, da peneira de fundo até a peneira de 1,400 mm.

Para peneiração, o material moído de cada tipo de semente foi vertido separadamente na mecha superior de 1,400 mm, então o equipamento foi programado para agitação de cinco minutos.

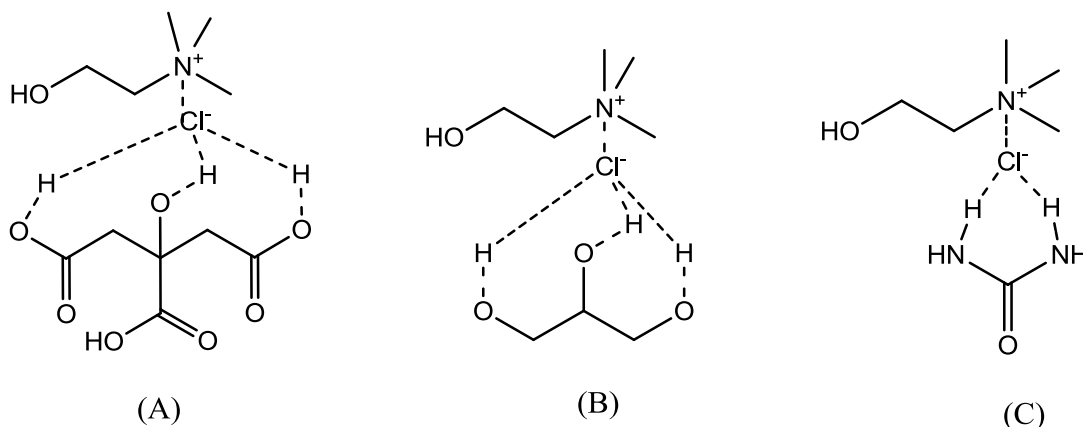
Após a determinação da semente com maior teor de *L*-dopa, também foi realizado o estudo da distribuição granulométrica deste tipo de semente. A massa total desta semente foi pesada antes de ser vertida na montagem de mesh e após a separação, a massa de semente em cada peneira foi determinada para que então o estudo de distribuição granulométrico pudesse ser realizado.

4.3 Preparo dos SEP

Foram preparados 3 tipos de solventes eutéticos profundos: cloreto de colina com ácido cítrico, cloreto de colina com ureia e cloreto de colina com glicerol. As misturas contendo glicerol e ureia foram preparadas de acordo com a metodologia utilizada por CUNHA et al. (2018). Para o preparo do SEP-ácido cítrico, foi utilizada a adaptação feita por VIEIRA et al. (2018) e SMITH et al. (2014). A adaptação foi feita com a adição de água, apenas para o ajuste de viscosidade e facilitar o manuseio do solvente. Os dois compostos (cloreto de colina e composto doador de interação de hidrogênio) foram então misturados e submetidos a um banho de aquecimento em glicerina a 80 °C com agitação magnética por 2 horas. Após esse tempo, o aquecimento foi desligado e a agitação permaneceu até o total resfriamento da mistura. Após o preparo, a mistura foi armazenada em um frasco e mantida à temperatura ambiente.

Na Figura 5 estão representadas as interações formadas nas soluções dos SEP preparados.

Figura 5: Representação de interações de hidrogênio nos SEP. (A) SEP-ácido cítrico: cloreto de colina e ácido cítrico; (B) SEP-glicerol: cloreto de colina e glicerol; (C) SEP-ureia: cloreto de colina e ureia.



Fonte Autora (Programa ChemDraw Ultra 12.0)

Estes três SEP foram preparados após um estudo das estruturas químicas de cada componente, de forma que os solventes pudessem interagir com a molécula da *L*-dopa.

4.4 Métodos analíticos

Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise das amostras obtidas das extrações para identificação da *L*-dopa e/ou presença de outros compostos também extraídos. Através do CLAE, também foi determinada a curva analítica padrão da *L*-dopa, para posteriormente, ser realizado o cálculo da concentração em cada reação realizada. O aparelho utilizado foi o Shimadzu modelo LC10AD, como fase estacionária a coluna C18 e como fase móvel, uma solução de água deionizada e ácido acético (99:1). O comprimento de onda utilizado no equipamento foi de 284 nm, com fluxo de 0,7 mL por minuto e pressão de 114 kgf/cm² à aproximadamente 27 °C. Os parâmetros citados acima foram obtidos no trabalho de MOURA, G. A. (2016).

4.4.1 Determinação das curvas padrão da *L*-dopa

Neste trabalho, foram feitas três curvas analíticas: a primeira curva padrão da *L*-dopa, uma segunda curva padrão da *L*-dopa foi necessária devida a troca da coluna C18 do equipamento e uma terceira curva padrão da *L*-dopa para ser utilizada exclusivamente nos experimentos dos planejamentos estatísticos. As curvas estão representadas no anexo.

A fase móvel utilizada na análise em CLAE, para a determinação da curva padrão da *L*-dopa, consistiu na mistura de água deionizada e 1% (v/v) de ácido acético. Para as duas primeiras curvas padrão da *L*-dopa, a concentração máxima foi de 0,4 mg mL⁻¹. Para a curva padrão utilizada exclusivamente nos planejamentos estatísticos, a concentração máxima foi de 0,1 mg mL⁻¹. Através dessa solução foram preparadas por diluição, amostras de diferentes concentrações. Cada solução foi injetada três vezes no equipamento CLAE.

4.5 Extração da *L*-dopa

4.5.1 Determinação do tipo de semente com maior concentração de *L*-dopa

Nestes experimentos foram utilizados 2 g de semente moída, 2 g de água deionizada e 1 g de SEP. O SEP utilizado para a triagem foi o SEP-ácido cítrico. As granulometrias escolhidas foram as três com menores diâmetros. As extrações foram realizadas em triplicatas e a média das massas de cada componente, foram relacionados nas tabelas 2 e 3:

Tabela 2 - Massa de cada componente do teste de concentração para *M. cinerea* (branca).

Granulometria (mm)	Tubo	Semente (g)	SEP (g)	Água (g)
<0,300	1	2,0110	1,0120	2,0440
0,300	2	2,0015	1,0342	2,0233
0,425	3	2,0048	0,9908	1,9994

Tabela 3 - Massa de cada componente do teste de concentração para *M. pruriens* (preta).

Granulometria (mm)	Tubo	Semente (g)	SEP (g)	Água (g)
<0,300	1	1,9999	0,9853	2,0589
0,300	2	2,0044	1,0074	2,0499
0,425	3	1,9971	1,0097	2,0136

As extrações foram realizadas sob agitação magnética em tubos fechados, a 30 °C, por 30 minutos. Após o término do tempo de extração, foi retirada uma alíquota de 20 µL da solução de cada frasco e adicionado à essa alíquota mais 4980 µL de água deionizada, totalizando 5 mL de amostra a ser analisada por CLAE, para que as áreas dos picos fossem encontradas e relacionadas com a concentração de *L*-dopa de cada alíquota.

4.5.2 Determinação da granulometria ideal da semente moída para a extração

Após a determinação do tipo de *Mucuna* com maior concentração de *L*-dopa, todos as granulometrias dessa semente foram testadas em extração com SEP-ácido cítrico. Foi utilizado 1 g de cada pó de semente, após a separação granulométrica. A extração foi realizada sob agitação magnética em tubos fechados, por 30 minutos e 30 °C. Após o término do tempo de extração foi retirada uma alíquota de 20 µL e analisada por CLAE, da mesma forma como foi feito no item 4.5.1. Os dados utilizados nesse experimento, foram descritos na Tabela 4:

Tabela 4 - Massas pesadas de reagentes em cada tubo.

Granulometria (mm)	Tubo	Massa semente (g)	Massa SEP (g)	Massa água (g)
<0,300	1	1,0110	1,0120	3,0440
0,300	2	1,0015	1,0342	3,0233
0,425	3	1,0048	0,9908	2,9994
0,710	5	1,0065	1,0045	3,0344
1,180	6	1,0031	1,0041	3,0087

4.5.3 Determinação do melhor método e melhor solvente de extração da *L*-dopa

Após a determinação do tipo de semente que fornece o maior rendimento de extração, foram testados três métodos de extração: micro-ondas, ultrassom e agitação magnética com aquecimento. Além das soluções dos três SEP testados como solventes, foram testadas também extrações utilizando etanol, água e mistura água/etanol (1:1). Para estes experimentos, alguns parâmetros foram mantidos constantes, como a temperatura fixa a 65 °C e o volume total de solvente utilizado de 3 mL, como proposto pela metodologia utilizada por ALAÑÓN et al. (2018). Foram utilizados três tempos diferentes de extração: 5, 10 e 20 minutos. O planejamento para estes testes está relacionado na Tabela 5.

Tabela 5 - Teste de extração, variando o tempo e o solvente extrator.

Tubo	Tempo (min)
Etanol (3 mL)	5
	10
	20
Água (3 mL)	5
	10
	20
Água+SEP-ác.cítrico (2,25 mL + 0,75 mL)	5
	10
	20
Água+Etanol (1,5 mL + 1,5 mL)	5
	10
	20

No caso das soluções de SEP foram utilizados 0,75 mL correspondente a 0,96 g. Optou-se por diminuir a quantidade de SEP pela metade, visando economia. Foram utilizados 0,5000 g de semente moída de mucuna branca, da granulometria de 1,180 mm de diâmetro. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

De cada tubo foi retirada uma alíquota que foi preparada de acordo com a metodologia descrita em 4.5.1, para a injeção em CLAE e a segunda curva padrão de *L*-dopa (anexo A8.1.2) foi utilizada na determinação da concentração do composto nas extrações.

4.5.3.1 O método de extração por aquecimento e agitação magnética

Para este teste, foi utilizada uma chapa de aquecimento e agitação da marca Thelga, com temperatura fixa em 65 °C. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Para cada um dos solventes extratores foram utilizados tubos de vidro com tampa, onde foram adicionados 3 mL do solvente. Logo em seguida foi acrescentada 0,5000 g da semente moída.

4.5.3.2 O método de extração em Ultrassom

Para este teste, foi utilizado o equipamento ultrassom Elmasonic P da marca Elma, programado para potência de 100 W e frequência de 37 Hertz, temperatura de 65 °C e o volume total de solventes foi de 3 mL. As extrações foram realizadas em tubos de ensaio tampados com papel alumínio.

4.5.3.3 O método de extração em Micro-ondas

Para este teste, foi utilizado o equipamento micro-ondas da marca CEM Discover. A temperatura programada no equipamento foi de 65 °C com tempo de rampa igual a 1 minuto. Os experimentos foram realizados em tubos próprios para o uso em micro-ondas.

4.6 Otimização do procedimento de extração

Após a escolha dos melhores solventes e do método de extração, com o auxílio do professor César Reis (Departamento de Química, UFV), foram desenvolvidos planejamentos estatísticos com o objetivo de otimizar a extração. Em todos os experimentos a massa de semente de *Mucuna* foi fixada em 0,5 g. Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa computacional STATISTICA (data analysis software system), version 7. StatSoft, Inc. (2004). www.statsoft.com.

4.6.1 Planejamento Fatorial Completo 2^3

Em um estudo preliminar foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^3 sem repetição, em que os fatores temperatura, tempo de extração e concentração do extrator foram estudados (Tabela 6). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 20 µL que foi preparada de acordo com a metodologia descrita em 4.5.1.

Tabela 6 - Planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (m/m) %
1	30	15	15
2	30	15	30
3	30	30	15
4	30	30	30
5	40	15	15
6	40	15	30
7	40	30	15
8	40	30	30

4.6.2 Caminho de ascensão ao máximo

Um segundo planejamento foi proposto em que os níveis dos fatores são gradativamente elevados de acordo com a tendência obtida a partir dos resultados do fatorial

completo. A esse procedimento dá-se o nome de “caminho de ascensão ao máximo”. Neste experimento, a concentração do extrator foi mantida constante (Tabela 7). O mesmo planejamento foi usado para os três extratores.

Tabela 7 - Caminho de ascensão ao máximo.

T (°C) X1	t (min) X2	Conc. % (m/m) X3
50	40	30
55	45	30
60	50	30
60	60	30

4.6.3 Planejamento Fatorial Composto Central

Utilizando os resultados obtidos no estudo do caminho de ascensão ao máximo foi elaborado um planejamento composto central nas variáveis Tempo e Temperatura com quatro repetições no ponto central (Tabela 8).

Tabela 8 - Planejamento fatorial composto central.

Ensaio	Razão (m/m)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	30	40	40
2	30	60	40
3	30	40	60
4	30	60	60
5	30	35,9	50
6	30	64,1	50
7	30	50	35,9
8	30	50	64,1
9	30	50	50
10	30	50	50
11	30	50	50
12	30	50	50

4.7 Determinação quantitativa dos componentes presentes nos extratos liofilizados

4.7.1 Relação massa/massa extratos e *L*-dopa

Após os experimentos realizados nos planejamentos estatísticos para a otimização da extração, as soluções extratoras foram armazenadas e para cada extrato em de cada um dos SEP, as soluções foram liofilizadas. Para a determinação do teor de *L*-dopa presente nos extratos liofilizados, cerca de uma gota de cada extrato foi pesado e solubilizado em 7 mL de água liofilizada. Dessa solução, 20 µL foram injetados no equipamento CLAE. As áreas obtidas foram avaliadas pela segunda curva padrão da *L*-dopa (anexo A6.1.2), obtendo-se assim, a quantidade de *L*-dopa presente por grama de extrato. A relação entre a massa de extrato analisado em CLAE e sua respectiva quantidade de *L*-dopa estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Relação massa de *L*-dopa para massa de extrato.

Extrato	Massa de extrato (mg)	Quantidade <i>L</i> -dopa (mg)
SEP-glicerol	6,5	0,145
SEP-ácido cítrico	5,1	0,134
SEP-ureia	4,2	0,174

4.8 Atividade Antioxidante

O teste de atividade antioxidante foi realizado de acordo com a metodologia proposta por RUFINO (2007).

Uma solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) em metanol foi previamente preparada, atingindo-se uma absorbância inicial de 0,7120. O teste foi realizado em placas de microdiluição contendo 96 micropoços (TPP, Trasadingen Suíça). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 517 nm em leitor de placas de microdiluição (THERMO SCIENTIFIC, Vantaa, Finland).

Uma curva analítica com o antioxidante padrão 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) foi então preparada nas concentrações de 10-100 µg mL⁻¹. A reação entre o antioxidante e o radical foi realizada através da homogeneização de 25 µL de cada concentração do antioxidante e 175 µL da solução do radical DPPH em placas de microdiluição, as quais foram mantidas ao abrigo da luz. Após 1 hora foram realizadas as leituras da absorbância a 517 nm.

Foram realizados ensaios para atividade antioxidante de *L*-dopa sintética, obtida da marca Sigma Aldrich, dos extratos de *L*-dopa extraída da semente de mucuna em SEP-glicerol, SEP-ácido cítrico e SEP-ureia e cloreto de colina, ureia, ácido cítrico e glicerol puros. A partir da *L*-dopa sintética e dos extratos de *L*-dopa em SEP-glicerol, SEP-ácido cítrico e SEP-ureia, foram preparadas soluções na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram pesadas 2 mg de *L*-dopa sintética. De acordo com a quantificação da *L*-dopa presente em cada extrato (4.7.1) foram realizados cálculos para determinar a massa necessária de extrato com o equivalente a 2 mg de *L*-dopa extraída da semente. Para o preparo das soluções dos componentes dos SEP, primeiramente foi calculado a proporção de cada um deles na formulação dos solventes.

De acordo com o preparo dos SEP (4.3), para o SEP-ureia, a cada 10 g tem-se 5,38 g de cloreto de colina e 4,62 g de ureia. Para o SEP-ácido cítrico a cada 10 g de SEP, 4,73 g são de cloreto de colina e 5,26 g de ácido cítrico e para o SEP-glicerol, a cada 10 g de SEP, 5,7 g são de cloreto de colina e 4,3 g são de glicerol. Para o preparo das soluções a 1000 ppm, foi considerada a menor massa de cloreto de colina (4,73 g) e todas as massas dos componentes do SEP foram preparadas as soluções a partir de diluição em metanol. A partir dessa solução foram preparadas diluições ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Um volume 25 μL de cada solução foi adicionado a 175 μL da solução do radical DPPH. A reação foi mantida ao abrigo da luz e foram realizadas duas leituras da absorbância após 1 hora de reação. As análises foram realizadas em triplicata e o metanol foi utilizado como branco.

A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada pela equação:

$$AA\% = [1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}})] \times 100 \quad (1)$$

Sendo: A_{amostra} a absorbância da solução contendo todos os reagentes e A_{controle} , a absorbância da solução de DPPH. Como teste positivo foi usado o BHT, nas mesmas concentrações.

4.9 Ensaios biológicos de indução celular provocado pelos extratos de *L*-dopa em SEP

4.9.1 Eficiência da *L*-dopa em extrato para o tratamento de Mal de Parkinson

Inicialmente foram diluídos 10 mg de *L*-dopa em 250 μL de solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,5. Após a completa diluição da *L*-dopa foram adicionados 250 μL de DMSO seguido da adição de 500 mL do meio de cultivo celular. A diluição dos extratos de *L*-

dopa em SEP-ureia, SEP-glicerol e SEP-ácido cítrico foi realizada da seguinte maneira: a 250 μL de cada um deles foram adicionados 250 μL de DMSO. O volume retirado de cada solução preparada para os testes, as concentrações de cada composto estão indicadas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Volume da pré-diluição de cada composto que foi adicionado a cada poço onde estava sendo feito o cultivo celular.

Extrato de <i>L</i> -dopa	Volume 1 (μL)	Volume 2 (μL)	Volume 3 (μL)
Extrato em SEP-ureia	5	2,5	0,5
Extrato em SEP-glicerol	5	2,5	0,5
Extrato em SEP-ácido cítrico	5	2,5	0,5
<i>L</i> -dopa (padrão)	20	10	2,0

Tabela 11 – Concentração dos compostos usados no teste e concentração de DMSO presente no meio.

Extrato ácido Cítrico	Conc. Composto	Concentração 1 (DMSO 2,5%)	Concentração 2 (DMSO 1,3%)	Concentração 3 (DMSO 2,5%)
<i>L</i> -dopa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	19,2	0,48	0,24	0,048
Ác. cítrico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,1	0,1275	0,06375	0,01275
Cl. Colina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	7,41	0,18525	0,092625	0,018525
Extrato Uréia	Conc. Composto	Concentração 1 (DMSO 2,5%)	Concentração 2 (DMSO 1,3%)	Concentração 3 (DMSO 2,5%)
<i>L</i> -dopa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	24,8	0,62	0,31	0,062
Ureia ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,4	0,135	0,0675	0,0135
Cl. Colina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6,27	0,15675	0,078375	0,015675
Extrato Glicerol	Conc. Composto	Concentração 1 (DMSO 2,5%)	Concentração 2 (DMSO 1,3%)	Concentração 3 (DMSO 2,5%)
<i>L</i> -dopa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	20,7	0,5175	0,25875	0,05175
Glicerol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5	0,125	0,0625	0,0125
Cl. Colina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,79	0,09475	0,047375	0,009475
<i>L</i> -dopa	Conc. Diluição	Concentração 1 (DMSO 2,5%)	Concentração 2 (DMSO 1,3%)	Concentração 3 (DMSO 2,5%)
<i>L</i> -dopa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1×10^4	1×10^3	5×10^2	1×10^2

4.9.2 Estudo da citotoxicidade dos compostos testados

A toxicidade dos compostos e do DMSO foi avaliada em células HEK 293 – *Human embryonic kidney cell* (Célula embrionária de rim humana) – cultivadas utilizando o meio DMEM - *Dulbeccos Modified Eagles Medium* com adição de: 10%, soro fetal bovino (SBF),

1% penicilina/estreptomicina, 1% *L*-glutamina para manutenção celular e durante todo o processo elas foram incubadas a 37 °C em estufa e 5% de CO₂.

Ao atingir uma confluência aproximada entre 40-70% (1×10^5), o procedimento de contagem e observação da viabilidade das mesmas foram realizados pela técnica de exclusão de viabilidade celular usando azul de Trypan (STROBER, 1997) com auxílio de uma câmara de Neubauer. As células (1×10^4) foram cultivadas em cada poço de uma placa de 96 poços, como descrito em experimentos na literatura (HANSEN e BROSS, 2010; FERREIRA, 2012; AL-SHEDDI, 2015) com suplementação de 2,5% de SBF. Decorrido o período de 16 horas para que as células aderissem à superfície da placa, os compostos foram adicionados nas concentrações pré-determinadas, como apresentadas na Tabela 15, e as placas foram incubadas por 6, 12 e 24 horas.

A quantificação das células que permaneceram vivas após os tratamentos foi realizada pela análise da viabilidade metabólica pelo ensaio colorimétrico do sal de tetrazólio (MTT) (VAN MEERLOO, 2011). Decorrido o tempo de tratamento o meio de cultivo foi substituído por 10 µL de solução MTT ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) diluído em PBS. Após 4 horas de reação, o sobrenadante foi removido e o produto metabólico do MTT foi homogeneizado em 100 µL de Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO). A intensidade da cor proveniente do formazan (produto do metabolismo do MTT pela mitocôndria celular) foi avaliada por densidade óptica a 570 nm em leitor ELISA (SpectraMax M5 - Molecular Devices). Os poços que não receberam nenhum tratamento foram utilizados como controles negativos enquanto os poços tratados com DMSO a 2,5% foram utilizados como controle positivo. Todas as concentrações foram testadas em quadruplicatas.

Durante o planejamento desse ensaio foram sugeridas as seguintes dosagens de *L*-dopa: 10 µmol mL^{-1} , 5 µmol mL^{-1} e 1 µmol mL^{-1} . Considerando os desafios relatados para preparo das amostras para o teste, as concentrações obtidas foram: $5,07 \text{ µmol mL}^{-1}$, $2,54 \text{ µmol mL}^{-1}$ e $0,51 \text{ µmol mL}^{-1}$.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa Graphpad Prism 6.0. Os dados foram normalizados em valores percentuais tendo como referência de 100% de proliferação, a média de absorbância do controle negativo do seu respectivo tempo de tratamento. Finalizada essa etapa, os valores dos grupos foram submetidos ao teste ANOVA unicaudal seguido de um teste-T de múltiplas comparações pareadas (*L*-dopa *versus* Compostos), com blindagem do teste de Sidak para comparações múltiplas.

4.9.3 Extração de RNA total e Síntese de cDNA

As células HEK 293 foram cultivadas em meio DMEM (2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de “aminoácidos não essenciais” 100 i.u. mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB). A monocamada celular foi cultivada em garrafa plástica acondicionada em estufa a 37 °C com concentração de 5% de CO₂. Quando a monocamada celular atingiu estágio de semi-confluência, as células foram desagregadas de forma mecânica por aspersão de meio de cultivo, centrifugadas por 5 min a 2000 RPM e ressuspensa em 1 mL de DMEM. Com auxílio de um contador hematológico e de câmara de Neubauer, $2,8 \times 10^5$ células foram semeadas em cada poço de uma placa de cultivo celular de 6 poços. Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por DMEM suplementado com 2% de SFB e com suplementação adicional dos compostos a serem testados, informados na Tabela 12. A proliferação celular permitiu definir a concentração $1,92 \times 10^{-5}$ µg mL⁻¹ de *L*-dopa que foi padronizada para todos os compostos utilizados nos tratamentos. Todos os poços continham 0,25% de DMSO que favoreceu a diluição dos compostos.

Tabela 12 – Compostos adicionados em cada poço para tratamento da monocamada celular

Composto	Volume/poço (µL)	Composto	Volume/poço (µL)
SEP glicerol	25	SEP ác. cítrico	27
Extrato SEP-glicerol	25	Extrato ác. cítrico	27
SEP ureia	20,9	<i>L</i> -dopa	$5,18 \times 10^{-7}$
Extrato SEP-ureia	20,9		

Decorrido 12 horas de tratamento, o meio de cultivo foi removido e então, adicionado 1 mL de TRIzol (Invitrogen) e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma, C2432), etapa a partir da qual se adotou o protocolo sugerido pelo fabricante. Todas as etapas de extração foram realizadas a 4 °C e em condições livres de ribonucleases.

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 2% (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pelas leituras de absorbância a 230 nm, 260 nm e 280 nm em aparelho Spectramax M5 (*Molecular Devices*). O RNA total foi adicionado com 1 U/µL de DNase-RNase Free (Promega), para eliminação de DNA contaminante,

seguindo especificações do fabricante. As amostras foram amplificadas por PCR convencional utilizando iniciadores para o gene GAPDH para confirmar a ausência de contaminação por DNA celular. Como controle positivo foi utilizado uma amostra contendo DNA de da mesma linhagem celular. A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pela leitura no aparelho *SpectraDrop* (Molecular Devices) e as amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit ImPromII Reverse Transcriptase System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de amostras contendo 1 µg de RNA total.

4.9.4 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

Para avaliar as alterações em genes associados a LID, escolheu-se a técnica de PCR em tempo real que possui a vantagem de ser altamente sensível e permitir a quantificação de pequenas mudanças na expressão gênica (PFAFFL, 2001). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o aparelho ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Baseado nos valores de Ct (*Cycle threshold*), que é o ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi realizado a quantificação relativa pela média de cada replicata biológica calculada como $(\text{média CT}/10^{\beta\text{-actina}}) + (\text{média CT}/10^{\text{GAPDH}})$, sendo os genes β -Actina e GAPDH avaliados para a escolha do gene normalizador (controle endógeno) para quantificação dos genes alvos. A detecção foi realizada pelo sistema *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems).

As amostras foram analisadas em três repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação. Inicialmente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração ótima de iniciadores e da eficiência da reação. Os componentes para cada reação foram 1 µL de cDNA, 6,0 µL de 2X *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystem) e iniciadores nas concentrações de 200, 400, 600 e 1000 nM. O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 50 ng µL⁻¹, 25 ng µL⁻¹, 12,5 ng µL⁻¹, 6,25 ng µL⁻¹, 3,125 ng µL⁻¹ e 1,56 ng µL⁻¹ do cDNA. Para o cálculo do valor do coeficiente angular da reta (*slope*) foi utilizada a fórmula Eficiência PCR = $(10^{(1/\text{slope})} - 1) \times 100$. As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições: 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C e 1 minuto a 60 °C. A eficiência da PCR em tempo real foi calculada através de gráfico onde os valores de Ct foram dispostos no eixo das ordenadas e os valores de cada diluição, no eixo das abscissas.

Tabela 13 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	NCBI. #	Sequência 5' – 3'	Tm	Amplicon esperado	Fonte
hGRK3	1362778	GCGATTTGCACTACACCTT AGGGCTGTGACCTCTCAGAA	58.83 60.18	341 pb	(Teli et al., 2005)
GRK6	1004105	TAGCGAACACGGTGCTACTC GCT GATGTGAGGGAACTGGA	59.83 59.38	101 pb	(Balabanian et al., 2008)
hGRK6	1004105	CGAGAACATCGTAGCGAACA TCCGGGGTCACTTCATACTC	58.11 58.52	276 pb	(Teli et al., 2005)
β-Actina	1101	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT CTTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG	64.74 65.32	285	(Woerner et al., 2012)
GAPDH	1357943	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG GGGGTCATTGATGGCAACAATA	59.01 58.97	108	(Woerner et al., 2012)

*GNDF e h GNDF - gene associado ao crescimento neuronal; GRK3, hGRK3, GRK6, hGRK6 – genes associados ao tratamento contínuo com *L*-dopa e que, por essa razão, tornam-se hiperativas; β-Actina e GAPDH – genes expressos de forma constitutivas e que serão como controle endógeno.

5 Resultados e Discussão

5.1 Efeito do tipo de semente de *Mucuna* na extração de *L*-dopa

Com a finalidade de verificar o tipo de semente de *Mucuna* que possui maior teor de *L*-dopa foram utilizadas sementes de duas espécies de mucuna que foram *Mucuna cinerea* (branca) e *Mucuna pruriens* (preta) em diversas granulometrias das sementes moídas. Após as extrações foram determinados os teores de *L*-dopa por análises por CLAE, a partir da primeira curva analítica da *L*-dopa (anexo A8.1.1). As médias das áreas dos picos de cada extração de sementes das duas espécies de *Mucuna* e tamanhos de partículas estão relacionados na Tabela 14.

Tabela 14 - Área dos picos e concentração de acordo com as granulometrias e cor da semente.

Granulometria (mm)	Semente	Área	Concentração (mg mL ⁻¹)
<0,300	branca	2753771	0,148 ± 0,012
0,300	branca	3842299	0,202 ± 0,013
0,425	branca	3928216	0,206 ± 0,017
<0,300	preta	2551736	0,138 ± 0,019
0,300	preta	3518534	0,186 ± 0,014
0,425	preta	3703899	0,195 ± 0,011

Com posse destes dados, foi realizado o cálculo das concentrações de cada extração, utilizando a equação da primeira curva analítica (anexo A8.1.1). Através da equação da primeira curva padrão da *L*-dopa, temos que:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Área} + 199347}{20000000} \quad (2)$$

Para a mucuna branca, com granulometria 0,425 mm, a área foi de 3928216, então:

$$\text{Concentração}_{\text{m.branca}} = \frac{3928216 + 199347}{20000000} = 0,206 \text{ mg mL}^{-1}$$

Para a mucuna preta com a mesma granulometria a área foi de 3703899, então:

$$\text{Concentração}_{\text{m.preta}} = 0,195 \text{ mg mL}^{-1}$$

Com esses resultados foi observado que as concentrações obtidas na extração de *L*-dopa da mucuna preta e branca são parecidas, com um pequeno aumento da quantidade extraída para as sementes brancas. Assim, a *Mucuna cinerea* (semente branca) foi escolhida para a continuação das próximas etapas.

5.2 Análise Granulométrica

Após a determinação da *Mucuna cinerea* como a semente que apresenta maior teor de *L*-dopa foi realizada a análise granulométrica. A massa total de semente peneirada foi de 633,50 g. Sendo assim, após a separação granulométrica, a massa de semente moída obtida em cada peneira foi relacionada na Tabela 15.

Tabela 15 - Massa de semente em cada diâmetro de partículas em análise.

(Dp) Diâmetro de partícula (mm)	Massa das sementes peneiradas (g)
Peneira fundo <0,3	151,03
0,300	68,31
0,425	120,88
0,710	226,22
1,180	53,38
1,400	8,681

A partir desses dados, foram realizados os cálculos referentes à granulometria de peneirados. Utilizando o modelo de Gates Gaudin Schumann, temos que a fórmula do modelo é dada por:

$$X = (D_p/D')^m \quad (3)$$

Linearizando:

$$\ln X = m \cdot \ln D_p - m \cdot \ln D \quad (4)$$

Para o cálculo da fração acumulativa, temos:

$$X = (\text{massa total} - D_p \text{ próprio} - D_p \text{'s acima}) / \text{massa total}$$

Como exemplo de cálculo, considere a granulometria 0,710:

$$X = (633,50 \text{ g} - 226,22 - 53,38 - 8,68) / 633,50 \text{ g} = 0,544940$$

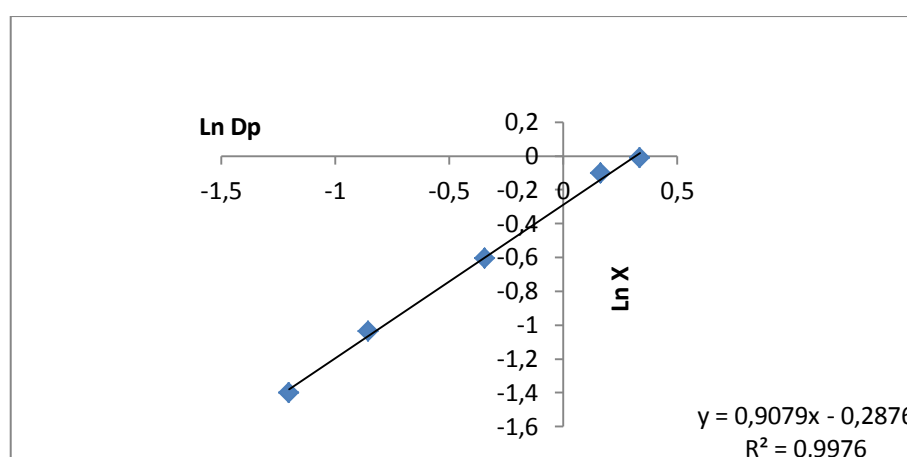
Os outros cálculos restantes, bem como o $\ln X$ e $\ln D_p$ foram efetuados e relacionados na Tabela 16.

Tabela 16 - Fração cumulativa, $\ln X$ e $\ln D_p$ de cada diâmetro de partícula.

Diâmetro de partícula (Dp)	Massa de sementes peneiradas	X (fração cumulativa da peneira)	Ln do Diâmetro de partícula	Ln de x
1,400	8,681	0,986297	0,336472	-0,0138
1,180	53,38	0,902035	0,165514	-0,1031
0,710	226,22	0,544940	-0,34249	-0,60708
0,425	120,88	0,354127	-0,85567	-1,0381
0,300	68,31	0,246298	-1,20397	-1,40121

Encontrando assim, a curva mostrada na Figura 6:

Figura 6 - Distribuição granulométrica das sementes de *Mucuna cinerea*.



Fonte: Autora

Como a correlação encontrada para tal linearização foi satisfatória, pode-se usar tal modelo para descrever a distribuição granulométrica para as sementes de *Mucuna cinerea*. Como m é o coeficiente linear então $m = 0,9079$, D' pode ser encontrado de seguinte forma:

$$-m \cdot \ln D' = -0,2876$$

$$D' = \exp^{\frac{0,2876}{0,9079}} = 1,37269$$

$$X = (Dp / 1,37269)^{0,9079}, \text{ Dp em milímetros.}$$

5.3 Determinação da granulometria ideal da semente moída para extração

A partir da escolha da *Mucuna cinerea* (semente branca), para a continuação dos experimentos, a metodologia descrita no item 4.5.2 foi aplicada. Os resultados obtidos foram relacionados na tabela 17.

Tabela 17 - Áreas e concentrações de cada análise granulométrica.

Granulometria (mm)	Área (média)	Concentração (mg mL ⁻¹)
<0,300	914528	0,056 ± 0,011
0,300	965688	0,058 ± 0,008
0,425	1101058	0,065 ± 0,010
0,710	1097651	0,064 ± 0,009
1,180	1916711	0,106 ± 0,015

A partir dos dados obtidos, observou-se que a granulometria de 1,180 mm é a que apresentou maior concentração de *L*-dopa extraída nas partículas, sendo, portanto, a granulometria ideal.

5.4 Determinação do melhor método e solvente de extração

Estas etapas envolvem a relação de técnicas como aquecimento e agitação, extração em micro-ondas e ultrassom que podem melhorar a extração com determinado solvente utilizado, inclusive os solventes eutéticos profundos.

5.4.1 O método de extração por aquecimento e agitação

Para o método de extração por aquecimento e agitação magnética foram utilizadas as soluções dos três tipos de SEP, água, etanol e etanol/água (1:1). As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.3.1 e os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 18.

Tabela 18 - Concentrações obtidas nas extrações pelo método de aquecimento e agitação

Solvente	Tempo (minutos)	Concentração de <i>L</i>-dopa (mg mL⁻¹)
Água	5	0,0196 ± 0,002
	10	0,0226 ± 0,002
	20	0,0248 ± 0,001
Água + SEP-ácido cítrico	5	0,0204 ± 0,011
	10	0,0241 ± 0,007
	20	0,0342 ± 0,008
Água + SEP-glicerol	5	0,0223 ± 0,010
	10	0,0247 ± 0,009
	20	0,0266 ± 0,010
Água + SEP-ureia	5	0,0169 ± 0,002
	10	0,0195 ± 0,010
	20	0,0218 ± 0,012
Água + Etanol	5	0,0170 ± 0,002
	10	0,0186 ± 0,009
	20	0,0190 ± 0,009
Etanol	5	0,0172 ± 0,004
	10	0,0257 ± 0,002
	20	0,0304 ± 0,003

Através dos resultados obtidos, verifica-se que pelo método de agitação e aquecimento o SEP-glicerol e SEP-ácido cítrico mostraram ser os solventes mais eficientes em termo de extração. No caso da extração utilizando o SEP-ácido cítrico, a variação da concentração de *L*-dopa extraída se mostrou elevada ao aumentar o tempo de extração. Já o SEP-ureia se mostrou dentre os solventes eutéticos ser o menos eficiente. Observa-se que a extração com água apresentou uma eficiência maior em comparação com o SEP-ureia. Em contrapartida, a água extraiu vários outros compostos juntamente com a *L*-dopa, sendo menos seletiva. No caso da extração com água mais etanol, o SEP-ureia mostrou-se um pouco mais eficiente, tanto como solvente seletivo, quanto pela eficiência. O etanol também se mostrou como um bom solvente extrator, porém extraiu outras substancias além da *L*-dopa. Deve-se lembrar que o etanol é um solvente volátil e não se deve descartar a possibilidade de volatilização ao longo do tempo da extração por aquecimento e agitação, o que pode justificar a alta concentração de *L*-dopa na extração por 20 minutos, devido a diminuição do volume de solvente.

5.4.2 O método de extração em Ultrassom

Para o método de extração em ultrassom foram utilizadas as soluções dos três tipos de SEP, água, etanol e etanol/água (1:1). As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.3.2 e os resultados obtidos foram relacionados na Tabela 19.

Tabela 19 - Concentrações obtidas nas extrações com água pelo método ultrassom.

Solvente	Tempo (minutos)	Concentração de <i>L</i>-dopa (mg mL⁻¹)
Água	5	0,0304 ± 0,002
	10	0,0402 ± 0,002
	20	0,0416 ± 0,002
Água + SEP-ácido cítrico	5	0,0364 ± 0,011
	10	0,0428 ± 0,008
	20	0,0445 ± 0,014
Água + SEP-glicerol	5	0,0223 ± 0,011
	10	0,0247 ± 0,009
	20	0,0266 ± 0,010
Água + SEP-ureia	5	0,0169 ± 0,002
	10	0,0195 ± 0,001
	20	0,0218 ± 0,003
Água + Etanol	5	0,0184 ± 0,003
	10	0,0322 ± 0,010
	20	0,0332 ± 0,012
Etanol	5	0,0177 ± 0,009
	10	0,0300 ± 0,012
	20	0,0326 ± 0,010

Pelo método de extração por ultrassom, observa-se que a extração com SEP-ácido cítrico apresentou o maior teor de *L*-dopa. A água também se mostrou como um bom solvente extrator. O SEP-glicerol apresentou variação pequena nas extrações com relação ao tempo. O SEP-ureia mostrou ser o solvente menos eficiente em termos de extração, porém foi mais seletivo nas análises realizadas para extração da *L*-dopa. A mistura de água com etanol mostrou-se um pouco mais eficiente que o etanol puro.

5.4.3 O método de extração em Micro-ondas

Para o método de extração em micro-ondas foram utilizadas as soluções dos três tipos de SEP, água, etanol e etanol/água (1:1). As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.3.3 e os resultados obtidos foram relacionados na Tabela 20.

Tabela 20 - Concentrações obtidas nas extrações pelo método micro-ondas.

Solvente	Tempo (minutos)	Concentração de <i>L</i>-dopa (mg mL⁻¹)
Água	5	0,0190 ± 0,006
	10	0,0270 ± 0,009
	20	0,0292 ± 0,007
Água + SEP-ácido cítrico	5	0,0213 ± 0,005
	10	0,0247 ± 0,007
	20	0,0260 ± 0,009
Água + SEP-glicerol	5	0,0205 ± 0,009
	10	0,0237 ± 0,008
	20	0,0254 ± 0,008
Água + SEP-ureia	5	0,0189 ± 0,004
	10	0,0210 ± 0,009
	20	0,0247 ± 0,007
Água + Etanol	5	0,0168 ± 0,006
	10	0,0243 ± 0,009
	20	0,0246 ± 0,010
Etanol	5	0,0048 ± 0,001
	10	0,0051 ± 0,001
	20	0,0060 ± 0,001

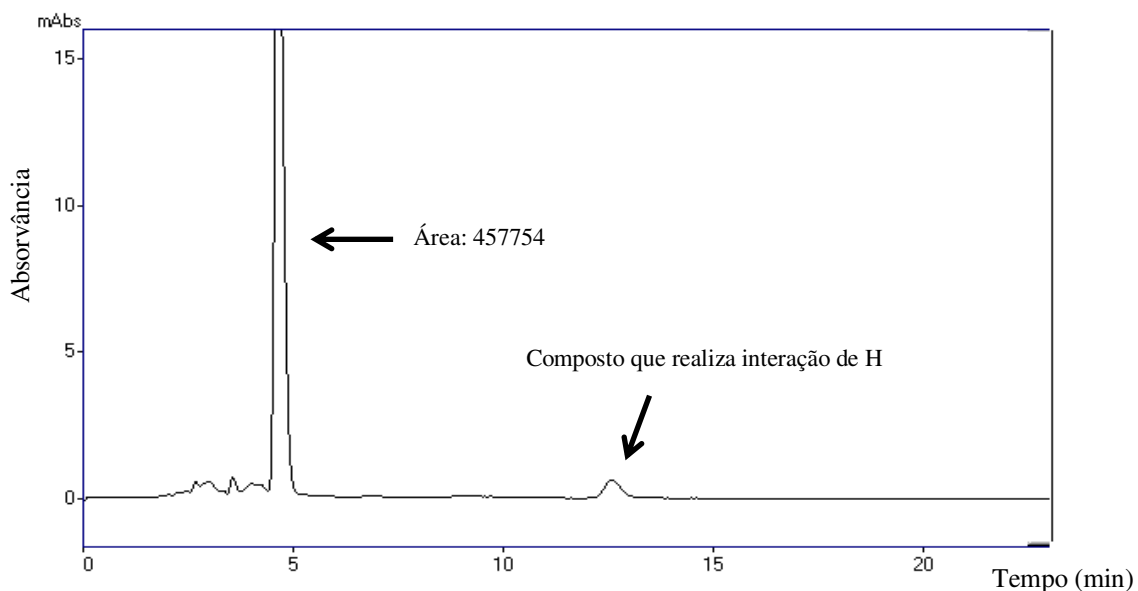
Como conclusão do uso do método de extração por micro-ondas auxiliando na extração de *L*-dopa pode-se observar que todos os solventes apresentaram resultados muito próximos. Exceção é feita para o etanol, que apresentou concentrações muito baixas de extração em comparação com todos os outros solventes e métodos. Os SEP-ácido cítrico e SEP-glicerol, apresentaram performances parecidas em termos de extração e ambos se mostraram mais eficientes que o SEP-ureia. A água como solvente se mostrou melhor que a mistura de água e etanol e ambos se mostraram pouco seletivos pois extraiu um grande número de compostos sendo alguns deles observados com tempo de retenção próximo ao pico característico da *L*-dopa.

Ao término destes experimentos, observou-se que o método de extração utilizando o ultrassom se mostrou mais eficiente para todos os solventes. Por estes dados de maior teor de *L*-dopa obtidos por este método o planejamento de extração foi realizado utilizando o ultrassom como método ideal de extração nas próximas etapas.

Com relação aos melhores solventes extratores, além das concentrações obtidas, também foram analisados os cromatogramas fornecidos pelas análises em CLAE. Nas extrações realizadas com os SEP, em todos os métodos de extração, os cromatogramas obtidos seguiram o mesmo padrão: o pico característico da *L*-dopa aparece praticamente isolado e mais a frente que foi identificado como o composto doador da interação de H, na

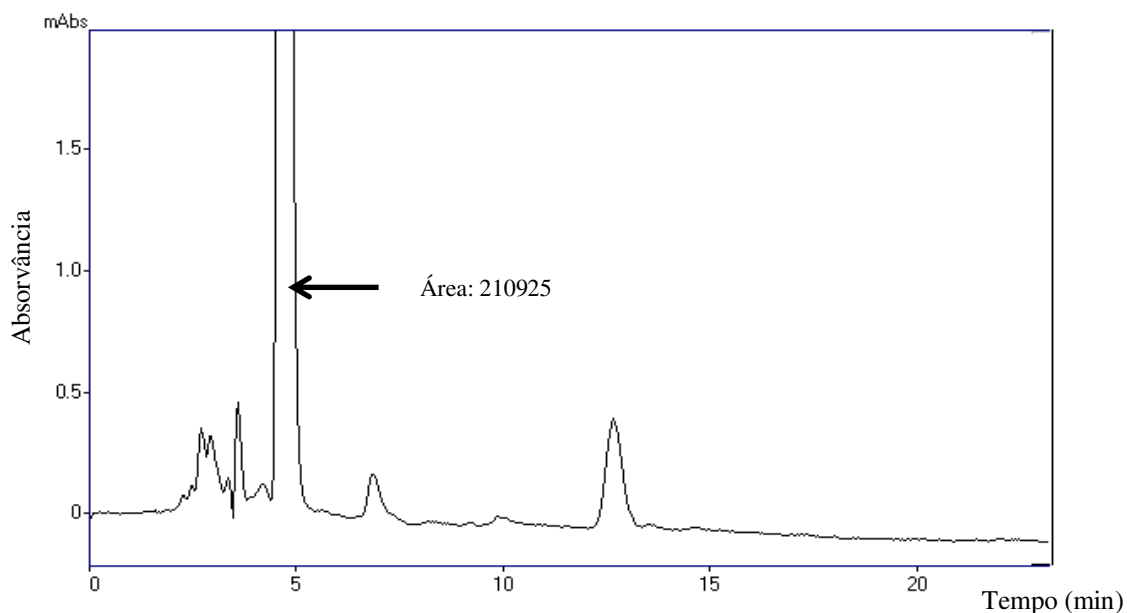
formação do SEP. A Figura 7 exemplifica os cromatogramas obtidos com as extrações utilizando o SEP-ácido cítrico.

Figura 7 - Cromatograma da extração de *L*-dopa com SEP-ácido cítrico pelo método ultrassom.



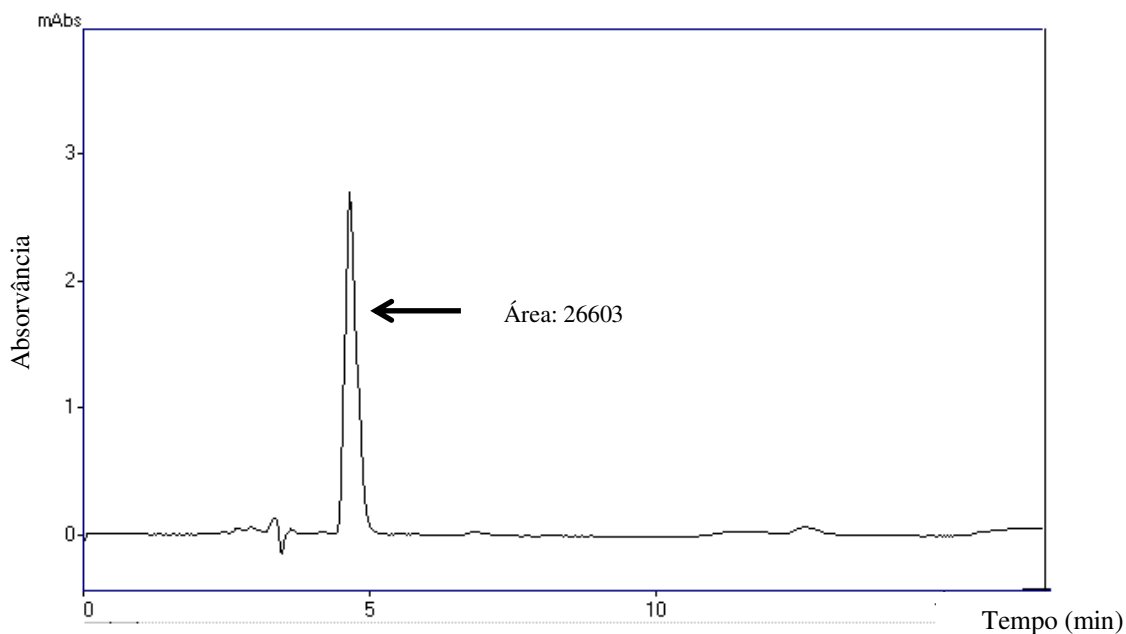
Já nos cromatogramas obtidos nas extrações com mistura água e etanol, para todos os métodos, os cromatogramas se mostraram complexos e vários outros picos, além do pico da *L*-dopa. A Figura 8, exemplifica o perfil dos cromatogramas obtidos.

Figura 8 - Cromatograma da extração de *L*-dopa com água mais etanol pelo método ultrassom.



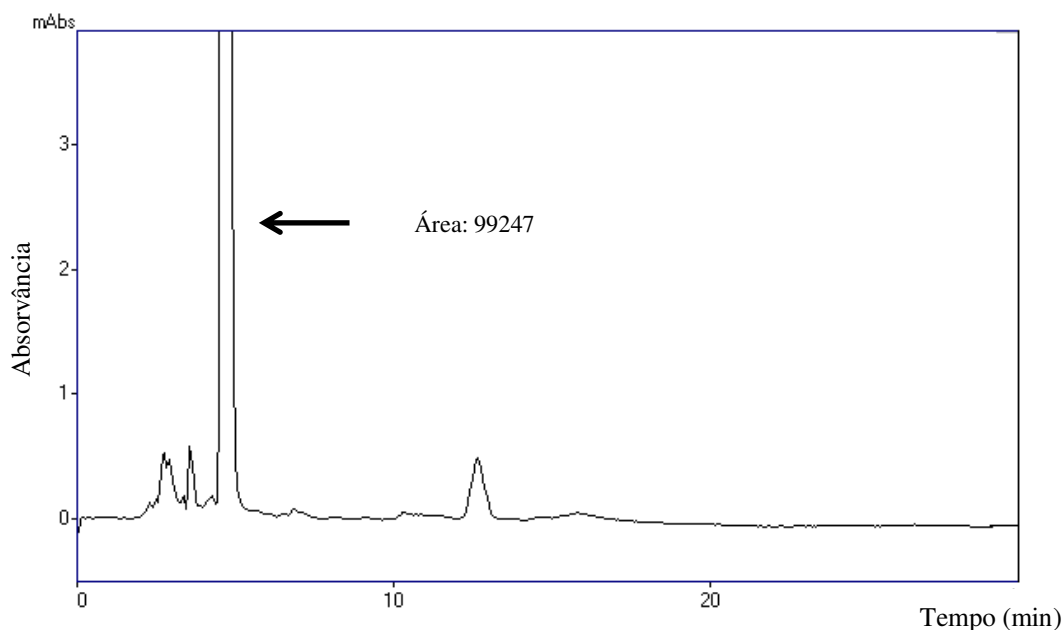
Os cromatogramas obtidos nas extrações com etanol também se mostraram desinteressantes e mostram o pico da *L*-dopa muito inferior ao pico obtido nas extrações com outros solventes (Figura 9).

Figura 9 - Cromatograma da extração de *L*-dopa com etanol pelo método ultrassom.



Nos cromatogramas obtidos nas extrações com água, além dos resultados não terem sido tão bons quanto aos resultados obtidos nas extrações com SEP, observou-se também outros picos próximos ao pico de interesse. A Figura 10 exemplifica os cromatogramas obtidos nas extrações com água.

Figura 10 - Cromatograma da extração de *L*-dopa com água deionizada.



Após observar e analisar todos os cromatogramas obtidos conclui-se que os SEP são as melhores escolhas para a continuidade dos estudos de extração da *L*-dopa. Além dos SEP terem se mostrado mais seletivos, de acordo com as análises dos cromatogramas, eles também se mostraram como solventes mais potentes na extração da *L*-dopa que os solventes tradicionais.

A eficiência de extração dos SEP quando comparado com solventes convencionais também foi observado nos experimentos realizados por BUBALO e colaboradores (2016) ao utilizar vários SEP e água-metanol na extração de compostos fenólicos presentes na casca da uva. Os rendimentos de extração se mostraram duas vezes maiores quando utilizado SEP em comparação com água-metanol. No trabalho de BUBALO e colaboradores (2016), o SEP-glicerol também foi um solvente eutético que apresentou uma das melhores performances na extração de fenólicos (BUBALO et al., 2016).

Assim, os três SEP foram escolhidos como melhores solventes para prosseguir os estudos de extração da *L*-dopa juntamente com o método ultrassom. Estes parâmetros foram utilizados para os próximos estudos realizados.

5.5 Planejamento Fatorial Completo 2³

De acordo com resultados laboratoriais de extração da *L*-dopa foi observado que os SEP apresentaram maior eficiência como solvente extrator com a vantagem de não serem voláteis. O método que se mostrou mais eficiente para a extração da *L*-dopa presente nas

sementes foi com ultrassom. Logo, a metodologia do item 4.6.1 foi aplicada e os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.5.1 Planejamento Fatorial Completo 2^3 para o SEP-glicerol

O experimento de extração foi realizado e após as análises por CLAE, as áreas foram obtidas e a concentração de *L*-dopa foi calculada utilizando a segunda curva analítica da *L*-dopa. As concentrações obtidas estão relacionadas na Tabela 21.

Tabela 21 - Concentração de *L*-dopa obtida através do Planejamento fatorial completo 2^3 para extração em ultrassom utilizando o SEP-glicerol.

Ensaio	Temp. (°C)	Tempo (min)	Conc. (m/m) %	Massa SEP (g)	Conc. <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Teor <i>L</i> -dopa (%)
1	30	15	15	0,75	0,0164	2,05
2	30	15	30	1,50	0,0166	2,07
3	30	30	15	0,75	0,0179	2,24
4	30	30	30	1,50	0,0183	2,29
5	40	15	15	0,75	0,0174	2,17
6	40	15	30	1,50	0,0180	2,25
7	40	30	15	0,75	0,0187	2,34
8	40	30	30	1,50	0,0198	2,48

O cálculo do rendimento das extrações foi realizado considerando que da solução extratora foram retirados 20 µL de extrato e diluídos em 5 mL para a análise em CLAE. A concentração obtida para o experimento 1 foi de 0,0164 mg mL⁻¹. Como foram preparados 5 mL da solução para análise em CLAE, temos que: 5 mL x 0,0164 mg mL⁻¹ = 0,082 mg de *L*-dopa. Para a solução extratora de 5 mL, temos:

Massa total de *L*-dopa foi calculada: (0,082 mg x 5 mL)/ 0,02 mL = 20,5 mg.

Como a massa total de semente utilizada foi de 0,5 g, então o teor de *L*-dopa extraído pode ser calculado da seguinte forma:

$$\text{Rendimento } L\text{-dopa: } \% = (20,5 \text{ mg} \times 100\%) / 500 \text{ mg} = 2,05\%$$

O tratamento estatístico dos dados da Tabela 21 permitiu a estimativa de modelos de equação linear (primeira ordem). As estimativas foram efetuadas com os valores em (%). Os coeficientes dos modelos com os respectivos erros estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Coeficientes do modelo de primeira ordem para o SEP-glicerol

Coef.	SEP-glicerol	
	valor	erro
b0	1,318125	$\pm 0,086395$
b1	0,014680	$\pm 0,002095$
b2	0,013119	$\pm 0,001397$
b3	0,004789	$\pm 0,001397$

O coeficiente b0 representa o termo independente, b1 representa a temperatura, b2 o tempo e b3 a concentração do extrator.

Os valores dos coeficientes em relação aos valores dos seus respectivos erros mostram que todos os coeficientes são significativos a 95% de probabilidade. Observa-se que todos os coeficientes possuem valores positivos, ou seja, todos colaboram para o aumento da porcentagem de extração quando seus níveis são aumentados, mas também é observado que b3 (concentração do extrator) apresenta valor muito baixo. Embora b3 contribua com o aumento da extração, o aumento devido a ele é muito pequeno em relação a b1 e b2.

Essas equações foram utilizadas para elaborar o planejamento do “caminho de ascensão ao máximo”.

5.5.2 Planejamento Fatorial Completo 2^3 para o SEP-ácido cítrico

Após as análises dos cromatogramas por CLAE, as áreas foram obtidas e as concentrações foram calculadas utilizando a segunda curva analítica construída com a *L*-dopa pura. As concentrações obtidas estão relacionadas na Tabela 23.

Tabela 23 - Concentrações de *L*-dopa obtidas através do Planejamento fatorial completo 2^3 para extração em ultrassom utilizando o SEP-ácido cítrico.

Ensaio	Temp. (°C)	Tempo (min)	Conc. (m/m) %	Massa DES (g)	Conc. <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Rendimento <i>L</i> -dopa (%)
1	30	15	15	0,75	0,0168	2,10
2	30	15	30	1,50	0,0172	2,15
3	30	30	15	0,75	0,0181	2,26
4	30	30	30	1,50	0,0189	2,36
5	40	15	15	0,75	0,0176	2,20
6	40	15	30	1,50	0,0179	2,24
7	40	30	15	0,75	0,0187	2,34
8	40	30	30	1,50	0,0197	2,46

O tratamento estatístico dos dados (Tabela 23) permitiu a estimativa de modelos de equação linear (primeira ordem). As estimativas foram efetuadas com os valores em (%). Os coeficientes dos modelos com os respectivos erros estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24 - Coeficientes do modelo de primeira ordem para o SEP-ácido cítrico.

Coef.	SEP-ácido cítrico	
	valor	erro
Bo	1,552367	± 0,073978
b1	0,009058	± 0,001794
b2	0,012286	± 0,001196
b3	0,005206	± 0,001196

Os coeficientes (Tabela 24) são os mesmos descritos no item 5.5.1 e também possuem o mesmo comportamento observado anteriormente. Observa-se que b3 (concentração do extrator) também apresenta um valor muito baixo nesta etapa. Também foi possível a elaboração de um planejamento do “caminho de ascensão ao máximo”, para o SEP-ácido cítrico.

5.5.3 Planejamento fatorial completo 2³ para o SEP-ureia

Após as leituras em CLAE, as áreas foram obtidas e as concentrações foram calculadas através da segunda curva padrão da *L*-dopa. As concentrações obtidas estão relacionadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Concentrações de *L*-dopa obtidas através do Planejamento fatorial completo 2³ para extração em ultrassom utilizando o SEP-ureia.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conc. (m/m)	Massa DES (g)	Conc. <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Rendimento <i>L</i> -dopa (%)
1	30	15	15	0,75	0,0152	1,89
2	30	15	30	1,50	0,0159	1,99
3	30	30	15	0,75	0,0165	2,06
4	30	30	30	1,50	0,0166	2,07
5	40	15	15	0,75	0,0170	2,12
6	40	15	30	1,50	0,0173	2,16
7	40	30	15	0,75	0,0176	2,34
8	40	30	30	1,50	0,0178	2,47

O tratamento estatístico dos dados da tabela acima permitiu a estimativa de modelos de equação linear (primeira ordem). As estimativas foram efetuadas com os valores em (%). Os coeficientes dos modelos com os respectivos erros são mostrados na Tabela 26.

Tabela 26 - Coeficientes do modelo de primeira ordem para o SEP-ureia.

Coef.	SEP-ureia	
	valor	erro
Bo	0,805873	± 0,172789
b1	0,026862	± 0,004191
b2	0,012910	± 0,002794
b3	0,004581	± 0,002794

Os coeficientes (Tabela 25) são os mesmos descritos no item 5.5.1 e também possuem o mesmo comportamento observado anteriormente. Foi possível a elaboração de um planejamento do “caminho de ascensão ao máximo”, para o SEP-ureia.

5.5.2 Caminho de ascensão ao máximo

De acordo com a metodologia proposta no item 4.6.2, este segundo planejamento estatístico, foi realizado para os três SEP.

5.5.2.1 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-glicerol

Após a obtenção dos cromatogramas por CLAE, as áreas e as concentrações foram calculadas utilizando a segunda curva padrão da *L*-dopa. As concentrações obtidas foram transformadas em % (m/m) e estão relacionadas na Tabela 27. A equação 5 foi obtida com os dados da Tabela 22. (Coeficientes do modelo de primeira ordem para o SEP-glicerol)

$$\% \text{ Extração} = 1,318 + 0,0147T + 0,0131t + 0,00479\text{Conc} \quad (5)$$

Tabela 27 - Concentrações obtidas de *L*-dopa através do caminho de ascensão ao máximo de extração em ultrassom com SEP-glicerol.

T (°C) X1	t (min.) X2	% (m/m) X3	Resposta experimental (%) m/m	Estimado pela regressão	Erro absoluto
50	40	30	2,000	2,52283	0,52283
55	45	30	2,050	2,61238	0,56238
60	50	30	2,100	2,70193	0,60193
60	60	30	2,220	2,83313	0,61313

Observa-se um aumento progressivo, embora não acentuado, da extração quando se aumentam os níveis das variáveis estudadas até um limite de 60 °C e 60 minutos de extração, por razões experimentais. Os valores estimados pela regressão, embora sejam nesta tendência, apresentaram desvios relativamente altos quando comparados aos valores experimentais, o que não invalida o procedimento. Esses resultados foram usados para planejar o experimento de superfície de resposta.

5.5.2.2 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-ácido cítrico

Após obtenção dos cromatogramas por CLAE, as áreas e as concentrações foram calculadas utilizando a segunda curva padrão da *L*-dopa. As concentrações obtidas foram transformadas em % (m/m) (Tabela 28). A equação 6 foi obtida da Tabela 24 e usada para estimar os valores de regressão (Tabela 28).

$$\% \text{ Extração} = 1,552 + 0,00906T + 0,0123t + 0,00521\text{Conc} \quad (6)$$

Tabela 28 - Concentrações obtidas através do caminho de ascensão ao máximo extração em ultrassom com SEP-ácido cítrico.

T (°C) X1	t (min.) X2	% (m/m) X3	Resposta experimental (%) m/m	Estimado pela regressão	Erro absoluto
50	40	30	2,050	2,57627	0,52627
55	45	30	2,080	2,66377	0,58377
60	50	30	2,490	2,75127	0,26127
60	60	30	2,640	2,87417	0,23417

Observa-se que o comportamento do SEP-Ácido cítrico foi muito semelhante ao do SEP-glicerol, com os valores estimados pela regressão com desvios relativamente altos quando comparados aos valores experimentais, mas com a diferença que os erros diminuem com o aumento dos níveis dos fatores. Esses resultados também foram usados para planejar o experimento de superfície de resposta.

5.5.2.3 Caminho de ascensão ao máximo para o SEP-ureia

Após obtenção dos cromatogramas por CLAE, as áreas e as concentrações foram calculadas utilizando a segunda curva padrão da *L*-dopa. As concentrações obtidas foram

transformadas em % (m/m) e estão relacionadas na Tabela 29. A equação 7 foi obtida com os dados da Tabela 26 e usada para estimar os valores de regressão (Tabela 29).

$$\% \text{ Extração} = 0,806 + 0,0269T + 0,0129t + 0,00458\text{Conc} \quad (7)$$

Tabela 29 - Concentrações obtidas através do caminho de ascensão ao máximo extração em ultrassom com SEP-ureia.

T (°C) X1	t (min.) X2	% (m/m) X3	Resposta experimental (%) m/m	Estimado pela regressão	Erro absoluto
50	40	30	1,820	2,35707	0,53707
55	45	30	1,940	2,44452	0,50452
60	50	30	2,080	2,53197	0,45197
60	60	30	2,170	2,66107	0,49107

Observa-se que o comportamento do SEP-ureia foi muito semelhante aos do SEP-glicerol e do SEP-ácido cítrico quando observada a tendência crescente da resposta com o aumento dos níveis dos fatores. Os valores estimados pela regressão também apresentaram desvios relativamente altos quando comparados aos valores experimentais, mas os desvios praticamente permaneceram constantes. Esses resultados também foram usados para planejar o experimento de superfície de resposta.

5.5.3 Planejamento fatorial composto central

Um terceiro planejamento constituindo a última etapa da otimização foi realizado, de acordo com o item 3.6.3, aproveitando os resultados do “caminho de ascensão ao máximo”. O objetivo deste planejamento é explorar a região em torno do que seria o máximo obtido do tratamento anterior.

5.5.3.1 Planejamento fatorial composto central para o SEP-glicerol

Os experimentos foram realizados para o SEP-glicerol de acordo com as condições descritas na Tabela 29.

Tabela 29 - Planejamento fatorial composto central de extração em ultrassom com SEP-glicerol.

Ensaio	Razão (m/m)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Rendimento <i>L</i> -dopa (%)
1	30	40	40	0,0417	5,21
2	30	60	40	0,0448	5,60
3	30	40	60	0,0488	6,10
4	30	60	60	0,0500	6,25
5	30	35,9	50	0,0435	5,45
6	30	64,1	50	0,0524	6,55
7	30	50	35,9	0,0436	5,45
8	30	50	64,1	0,0579	7,25
9	30	50	50	0,0505	6,31
10	30	50	50	0,0503	6,28
11	30	50	50	0,0505	6,31
12	30	50	50	0,0502	6,27

Com os dados das concentrações obtidas nas extrações nota-se um aumento de rendimento ao aumentar o tempo e a temperatura conjuntamente.

De acordo com BISWAS e colaboradores (2010), as sementes de *Mucuna* apresentam de 2,6% a 6,48% de *L*-dopa. Já o trabalho de VADIVEL e colaboradores (2000) foi encontrada a concentração de *L*-dopa nas sementes variando de 6,7% a 7% e em outro trabalho foi encontrada a concentração média de 5,3% de *L*-dopa (CASSANI et al., 2016).

Observa-se na Tabela 29, que a faixa de rendimento obtida de *L*-dopa variou de 5,21 a 7,25% que estão próximos à faixa de concentração de *L*-dopa presente nas amostras de *Mucuna* estudadas. Estas diferenças podem ser explicadas pelas variações genéticas, local de plantio e colheita, estágio da maturidade das sementes e também o método de extração (LONGHI et al., 2011).

O tratamento estatístico foi conduzido utilizando as respostas em % (m/m) e permitiu a estimativa de modelos matemáticos capazes de explicar o comportamento do sistema extrativo em função das variáveis tempo e temperatura, mantendo constante em 30% (m/m) a concentração dos extratores. O modelo estimado mais apropriado para descrever o comportamento do SEP-glicerol foi o quadrático sem o coeficiente de interação. Todos os coeficientes e seus respectivos erros estão listados na Tabela 30.

Tabela 30 - Coeficientes da equação de extração e seus respectivos erros, para o SEP-glicerol.

SEP-glicerol		
	Coeficientes	Erro
b₀ (Intercepto)	-5,390	± 0,312
b₁ (Tempo)	0,271	± 0,00822
b₁₁ (Tempo)²	-0,00244	± 0,00008
b₂ (Temperatura)	0,120	± 0,0082
b₂₂ (Temperatura)²	-0,00068	± 0,00008

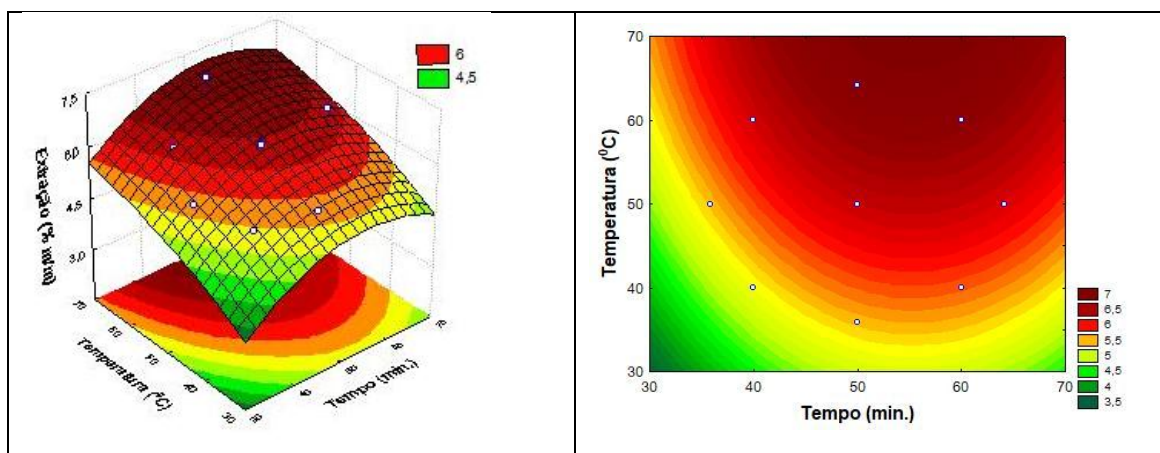
Todos os coeficientes foram significativos a 95% de probabilidade. As equações ajustadas podem também ser apresentadas por extenso (equação 8):

$$\% \text{Rendimento Extração} = -5,390 + 0,271 X_1 - 0,00244 X_{11} + 0,120 X_2 - 0,00068 X_{22} \quad (8)$$

Sendo: X_1 tempo, X_2 temperatura, X_{11} tempo quadrado, X_{22} temperatura quadrada

Tais modelos geraram as superfícies de respostas que possibilitaram a análise gráfica dentro do espaço experimental. Os gráficos da superfície de resposta e de sua projeção, para o SEP-glicerol estão mostrados na Figura 11.

Figura 11 - Superfície de resposta (A) e projeção da superfície (B) para o SEP-glicerol.



Fonte: César Reis, 2019.

Um aumento significativo da extração é observado quando tempo e temperatura são aumentados simultaneamente. Observa-se por meio dos gráficos que todas as condições experimentais que se encontram entre os pontos (50, 64), (60, 60) e (55, 58) produzem melhores resultados de extração quando se utiliza o SEP-glicerol. A estimativa das

porcentagens de extração para essas condições está em torno de 6,5%. É importante que a análise seja feita somente dentro do espaço experimental descrito pelo octógono.

5.5.3.2 Planejamento fatorial composto central para o SEP-ácido cítrico

Os experimentos foram realizados para o SEP-ácido cítrico de acordo com as condições descritas na Tabela 31.

Tabela 31 - Planejamento fatorial composto central de extração em ultrassom com SEP-ácido cítrico.

Tubo	Razão (m/m)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Rendimento <i>L</i> -dopa (%)
1	30	40	40	0,0406	5,07
2	30	60	40	0,0471	5,89
3	30	40	60	0,0449	5,61
4	30	60	60	0,0489	6,11
5	30	35,9	50	0,0373	4,66
6	30	64,1	50	0,0505	6,31
7	30	50	35,9	0,0396	4,95
8	30	50	64,1	0,0514	6,43
9	30	50	50	0,0487	6,08
10	30	50	50	0,0486	6,08
11	30	50	50	0,0485	6,06
12	30	50	50	0,0486	6,07

Observa-se neste experimento que a variação de extração da *L*-dopa foi de 4,66% a 6,43%. A média dessas extrações é muito próxima a encontrada por CASSANI et al. (2016), cuja concentração média relatada é de 5,3% de *L*-dopa em sementes de *Mucuna*.

Um modelo matemático também foi estimado e capaz de explicar comportamento do sistema extrativo em função das variáveis tempo e temperatura, mantendo constante em 30% (m/m) a concentração dos extratores.

O modelo estimado mais apropriado para descrever o comportamento do SEP-ácido cítrico também foi o quadrático sem o coeficiente de interação. Todos os coeficientes e seus respectivos erros estão listados na Tabela 32.

Tabela 32 - Coeficientes da equação de extração e seus respectivos erros, para o SEP-ácido cítrico.

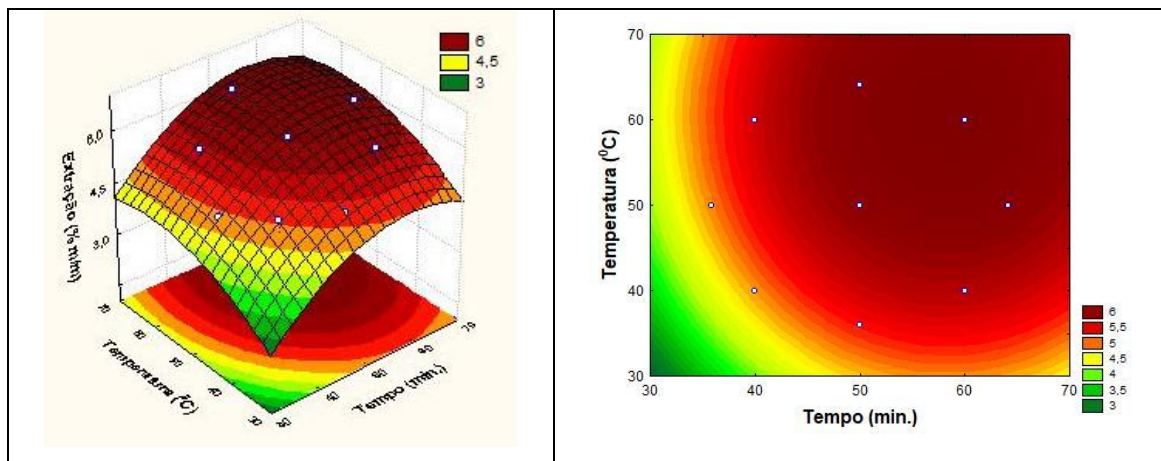
SEP-ácido cítrico		
	Coeficientes	Erro
b₀ (Intercepto)	-9,115	± 0,145
b₁ (Tempo)	0,320	± 0,00381
b₁₁ (Tempo)²	-0,00274	± 0,000038
b₂ (Temperatura)	0,207	± 0,00381
b₂₂ (Temperatura)²	-0,00171	± 0,000038

Todos os coeficientes foram significativos a 95% de probabilidade. A equação ajustada pode também ser apresentada por extenso (equação 9):

$$\% \text{Rendimento Extração} = -9,115 + 0,320 X_1 - 0,00274 X_{11} + 0,207 X_2 - 0,00171 X_{22} \quad (9)$$

O modelo gerou a superfície de resposta que possibilitou a análise gráfica dentro do espaço experimental. Os gráficos da superfície de resposta e sua projeção para o SEP-ácido cítrico estão mostrados na Figura 12.

Figura 12 - Superfície de resposta (A) e projeção da superfície (B) para o SEP-ácido cítrico.



Fonte: César Reis, 2019.

Um aumento significativo da extração é observado quando tempo e temperatura são aumentados simultaneamente. Observa-se por meio do gráfico da projeção que todas as condições experimentais que se encontram entre os pontos (50, 50), (50, 64), (60, 60) e (64, 50) produzem melhores extrações quando se utiliza o SEP-ácido cítrico. A estimativa das porcentagens de extração da *L*-dopa para essas condições está em torno de 6,0%.

5.5.3.3 Planejamento fatorial composto central para o SEP-ureia

Os experimentos foram realizados para o SEP-ureia de acordo com as condições descritas na Tabela 33.

Tabela 33 - Planejamento fatorial composto central de extração em ultrassom com SEP-ureia.

Tubo	Razão (m/m)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração <i>L</i> -dopa (mg mL ⁻¹)	Rendimento <i>L</i> -dopa (%)
1	30	40	40	0,0234	2,93
2	30	60	40	0,0278	3,48
3	30	40	60	0,0313	3,91
4	30	60	60	0,0334	4,18
5	30	35,9	50	0,0216	2,70
6	30	64,1	50	0,0320	4,01
7	30	50	35,9	0,0263	3,29
8	30	50	64,1	0,0346	4,33
9	30	50	50	0,0257	3,21
10	30	50	50	0,0259	3,25
11	30	50	50	0,0259	3,25
12	30	50	50	0,0258	3,23

Nota-se que o SEP-ureia não apresentou uma eficiência tão elevada quando comparada com os outros SEP usados nas extrações. A variação de extração de *L*-dopa foi de 2,70% a 4,33%. Esse valor é inferior ao que foi relatado por BISWAS et al. (2010) (2,6% a 6,48% de *L*-dopa nas sementes de *Mucuna*).

Um modelo matemático também foi estimado e capaz de explicar o comportamento do sistema extrativo em função das variáveis tempo e temperatura, mantendo constante em 30% (m/m) a concentração dos extratores.

O modelo estimado mais apropriado para descrever o comportamento do SEP-ureia também foi o quadrático sem o coeficiente de interação. Todos os coeficientes e seus respectivos erros são listados na Tabela 34.

Tabela 34 - Coeficientes da equação de extração e seus respectivos erros, para o SEP-ureia.

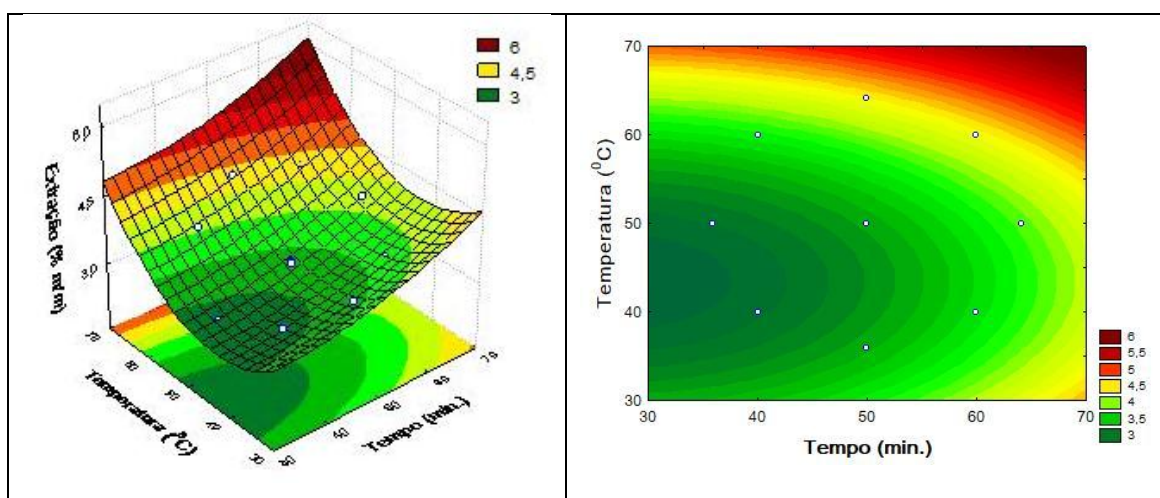
	SEP-ureia	
	Coeficientes	Erro
b₀ (Intercepto)	-9,115	± 0,145
b₁ (Tempo)	0,320	± 0,00381
b₁₁ (Tempo)²	-0,00274	± 0,000038
b₂ (Temperatura)	0,207	± 0,00381
b₂₂ (Temperatura)²	-0,00171	± 0,000038

Todos os coeficientes foram significativos a 95% de probabilidade. A equação ajustada pode também ser apresentada por extenso (equação 10):

$$\% \text{Rendimento Extração} = 8,841 - 0,0371 X_1 + 0,000706 X_{11} - 0,260 X_2 + 0,00299 X_{22} \quad (10)$$

O modelo gerou a superfície de resposta que possibilitou a análise gráfica dentro do espaço experimental. Os gráficos da superfície de resposta e de sua projeção para o SEP-ureia estão mostrados na Figura 13.

Figura 13 - Superfície de resposta (A) e projeção da superfície (B) para o SEP-ureia.



Fonte: César Reis, 2019.

Um pequeno aumento na extração é observado quando tempo e temperatura são aumentados simultaneamente dentro dos limites do espaço experimental. Esse fato pode ser explicado devido a diminuição da densidade dos SEP ao aumentar a temperatura da solução extratora. Com o solvente menos denso há aumento de energia de agitação e portanto maior mobilidade na solução. Quanto maior o tempo de exposição do solvente com as sementes maior a quantidade de *L*-dopa extraída.

Observa-se por meio do gráfico da projeção que todas as condições experimentais que se encontram entre os pontos (50, 64) e (60, 60), ou seja, estão na região de cor amarela da Figura 8 produz melhoria na extração quando se utiliza o SEP-ureia. A estimativa das porcentagens de extração para essas condições está em torno de 4,5%, portanto bem inferior aos SEP-glicerol e SEP-ácido cítrico.

Pelos resultados dos planejamentos estatísticos utilizando os solventes eutéticos profundos observou-se a eficiência, facilidade e rapidez para se obter o extrato de *L*-dopa. A eficiência e soberania das extrações que utilizam os SEP frente aos solventes comuns é afirmada quando comparado com o trabalho realizado por MISRA et al. (2007). Neste

trabalho, o maior rendimento de *L*-dopa obtido foi de 1,78% em extração com água-etanol (1:1) em agitação por uma noite. Em outro experimento também realizado por MISRA et al. (2007) foi obtido o rendimento de 0,98% em extração com água utilizando SO₂ como agente protetor contra oxidação. No presente estudo estatístico, o menor rendimento de *L*-dopa foi de 2,70% obtido em extração com SEP-ureia (30%) em ultrassom por 36 minutos a 50 °C.

Sendo assim, este experimento foi capaz de confirmar a eficiência dos SEP frente a solventes tradicionalmente usados, acelerando e simplificando o processo de extração.

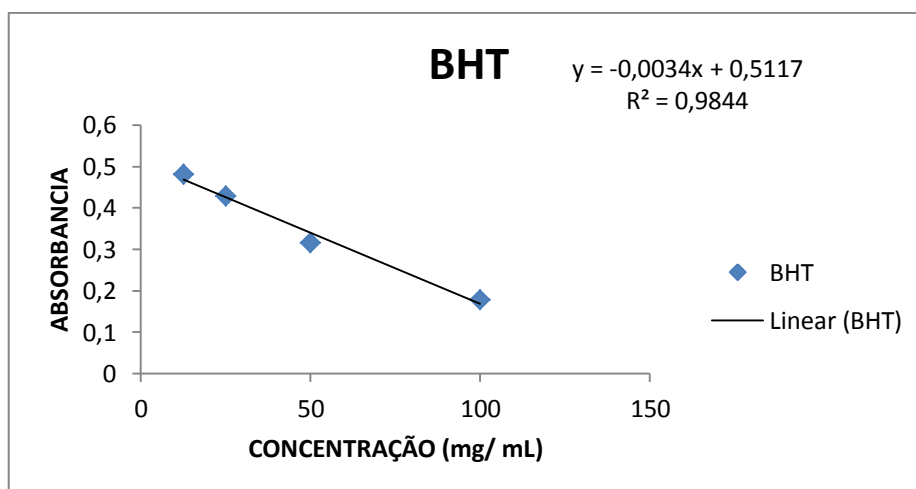
5.6 Ensaios Biológicos

5.6.1 Teste antioxidante

O teste antioxidante foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.8. Observou-se que imediatamente após adicionar as amostras contendo *L*-dopa aos poços contendo solução de DPPH houve mudança de cor de violeta escuro para incolor. Tais soluções se assemelharam visualmente ao controle positivo de BHT. Portanto, de forma qualitativa, foi possível confirmar a atividade antioxidante da *L*-dopa tanto sintética, quanto presente em extratos.

As amostras foram analisadas quantitativamente comparando os extratos contendo *L*-dopa com os da curva de absorbância *versus* concentração do BHT. O gráfico para esta curva foi plotado e descrito pela Figura 14.

Figura 14 - Gráfico de concentração x absorbância para o BHT.



A curva analítica do BHT é descrita pela equação 11:

$$y = -0,0034x + 0,5117 \quad (11)$$

onde: o coeficiente de determinação descrito por $R^2 = 0,9844$.

Com isso a atividade antioxidante dos compostos foi avaliada em termos de equivalentes do antioxidante BHT em mg mL^{-1} . De acordo com os dados da Tabela 56 (anexo), onde se encontram todas as médias das absorbâncias calculadas a partir dos dados obtidos em triplicata de cada composto. Como exemplo de cálculo, considere a equação 11 e a amostra do padrão de *L*-dopa na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, com absorbância média de 0,0765. Substituindo a absorvancia na equação 11, temos:

$$\text{Concentração} = \frac{0,5117 - 0,0765}{0,0034} = 129,41 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Logo, em termos de BHT, a concentração de *L*-dopa encontrada para a absorbância de 0,0765 é de $129,41 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o cálculo da massa de *L*-dopa em termos de BHT, sabe-se que o volume da solução era de 2 mL, logo:

$$\text{Massa} = \text{concentração} \times \text{volume} = 129,41 \mu\text{g mL}^{-1} \times 2 \text{ mL} = 258,82 \mu\text{g}$$

Com este cálculo a massa de *L*-dopa em termos de BHT é de $258,82 \mu\text{g}$.

Estes cálculos de equivalência de BHT foram realizados para todas as concentrações e todos os compostos e os resultados obtidos estão relacionados nas Tabelas 35 e 36.

Tabela 35 - Equivalente de BHT em μg para a *L*-dopa e seus extratos com SEP.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>L</i> -dopa	Equivalente	BHT	(μg)
		Extrato em SEP-glicerol	Extrato em SEP- ácido cítrico	Extrato em SEP- ureia
1000	258,82	255,58	257,17	243,18
500	257,16	253,14	252,07	227,71
250	257,12	245,80	245,43	183,71
125	256,00	224,27	227,31	152,90
62,5	248,43	172,76	181,70	40,45

Tabela 36 - Equivalente de BHT em μg para os SEP e seus componentes puros.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equivalente			BHT	(C)	Ureia
	Cl. de colina	SEP- glicerol	Glicerol	SEP-ác. cítrico	Ácido cítrico	
1000	-42,76	-40,53	-43,68	-41,15	0,57	0,56
500	-46,55	-45,82	-47,29	-42,56	0,57	0,58
250	-50,53	-49,47	-49,50	-43,70	0,57	0,58
125	-49,47	-49,41	-51,98	-43,41	0,57	0,58
62,5	49,13	-49,88	-53,35	-40,82	0,57	0,58

Na tabela 36 aparecem resultados negativos o que indica a falta de correspondente em termos de BHT, e por consequência, a ausência de atividade antioxidante. Com todas estas informações e as absorvâncias do BHT relacionadas na Tabela 41 (anexo A8.2.1) pode-se calcular o percentual de atividade antioxidante através da equação 12:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \frac{\text{Absorvância média BHT} - \text{Absorvância média } L\text{-dopa}}{\text{Absorvância média BHT}} \times 100 \quad (12)$$

De acordo com a Tabela 56, no anexo, a absorvância média do BHT é 0,5989, então:

$$\% \text{ atividade antioxidante } L\text{-dopa} = \frac{0,5989 - 0,0765}{0,5989} \times 100 = 88,03\%$$

Logo, o percentual de atividade antioxidante para a *L*-dopa a 1000 µg mL⁻¹, é de 88,03%.

Estes cálculos foram realizados para todas as concentrações de todos os compostos. Os resultados obtidos foram relacionados nas Tabelas 37 e 38.

Tabela 37 - Atividade antioxidante da *L*-dopa e seus extratos em SEP.

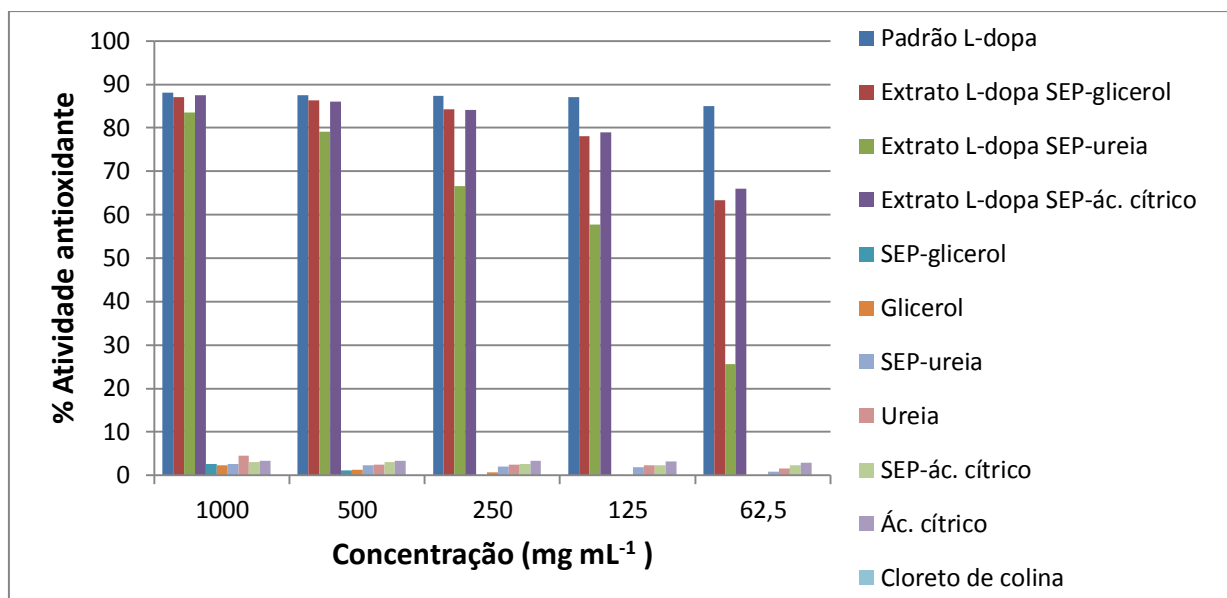
Concentração (µg mL ⁻¹)	% Atividade Antioxidante			
	<i>L</i> -dopa	Extrato em SEP- glicerol	Extrato em SEP-ácido cítrico	Extrato em SEP-ureia
1000	88,03	87,04	87,49	83,49
500	87,55	86,34	86,04	79,08
250	87,34	84,25	84,14	66,52
125	87,13	78,10	78,97	57,73
62,5	85,08	63,39	65,95	25,63

Tabela 38 - Atividade antioxidante dos SEP e seus componentes puros.

Conc. (µg mL ⁻¹)	Cl. de colina	% Atividade Antioxidante					
		SEP- glicerol	Glicerol	SEP-ác. Cítrico	Ácido cítrico	SEP- ureia	Ureia
1000	0	2,62	2,29	3,10	3,42	2,60	4,53
500	0	1,11	1,27	3,01	3,41	2,30	2,50
250	0	0,09	0,64	2,61	3,36	2,07	2,41
125	0	0,07	0	2,37	3,15	1,82	2,33
62,5	0	0	0	2,28	2,92	0,90	1,61

Os resultados obtidos foram organizados em um gráfico de barras (Figura 15).

Figura 15 - Atividade antioxidante da *L*-dopa e seus extratos, SEP e seus constituintes.



Fonte: Autora.

Através dos dados obtidos (Figura 15), observa-se que o padrão de *L*-dopa é o composto com maior atividade antioxidante quando comparado aos dos extratos liofilizados de *L*-dopa em SEP-glicerol, SEP-ácido cítrico e SEP-ureia em todas as concentrações avaliadas. O fato da *L*-dopa pura possuir atividade antioxidante maior que seu extrato, também foi relatado no trabalho de BISWAS et al. (2010), que utilizou extrato alcoólico ao invés de SEP. Porém em ambos os trabalhos foi observado que a *L*-dopa pura possivelmente terá maior atividade antioxidante em comparação com qualquer tipo de extrato da mesma. Mesmo assim, neste experimento os extratos de *L*-dopa em SEP-glicerol e SEP-ácido cítrico podem ser considerados como bons agentes antioxidantes nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade antioxidante foi mínima para os demais compostos, como os três SEP e seus componentes nas concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isso comprova que a atividade antioxidante está relacionada à presença de *L*-dopa dos materiais testados.

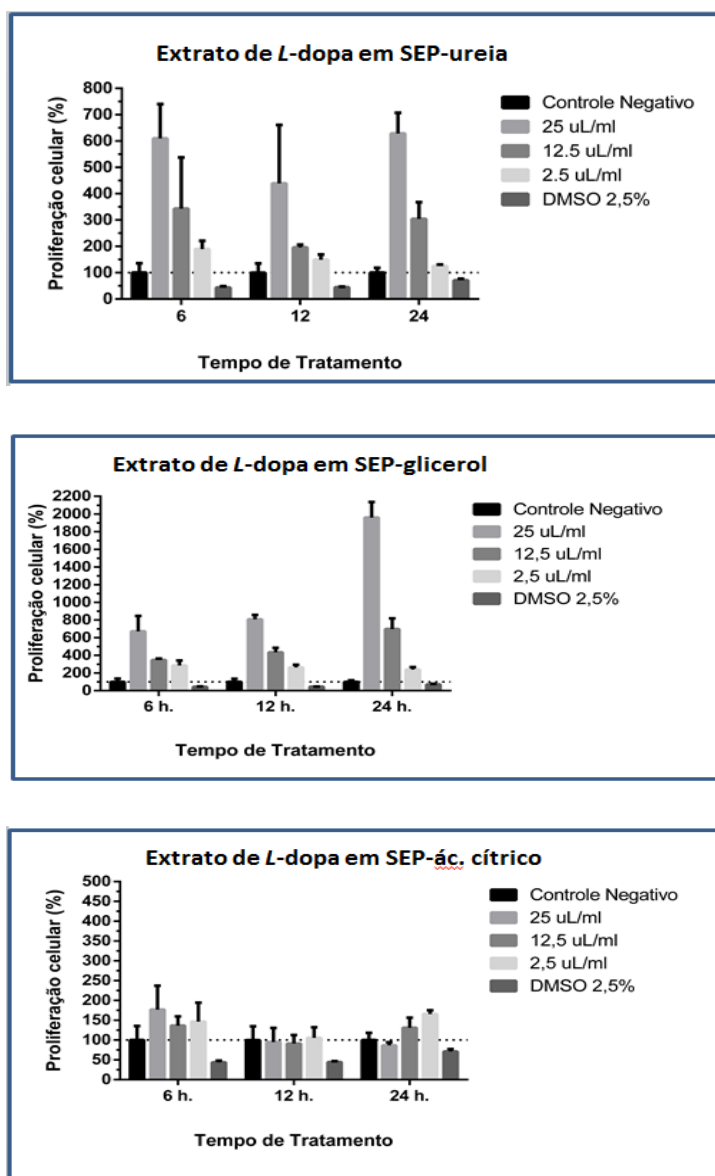
5.6.2 Eficiência do padrão de *L*-dopa e dos extratos de *L*-dopa em SEP no controle do Mal de Parkinson

5.6.2.1 Análise de proliferação em células HEK-293

Apesar do tratamento com *L*-dopa reduzir o tremor, rigidez e outros sintomas, o seu uso prolongado permite o desenvolvimento de flutuações na resposta motora e movimentos involuntários conhecidos como *L*-dopa-induced dyskinesia (LID) (GUIGONI, 2005; FAHN,

2008). Os genes GRKs desempenham papel importante na cascata de sinalização de vias ativadas pela *L*-dopa (AHMED, 2015), sendo as isoformas GRK6 e GRK3 aquelas associadas a um agravamento do quadro de LID quando sua produção é inibida (AHMED, 2008) e, por isso, esses genes têm sido estudados como alvos terapêuticos no tratamento de Parkinson (TERMAN, 2004; AHMED, 2015).

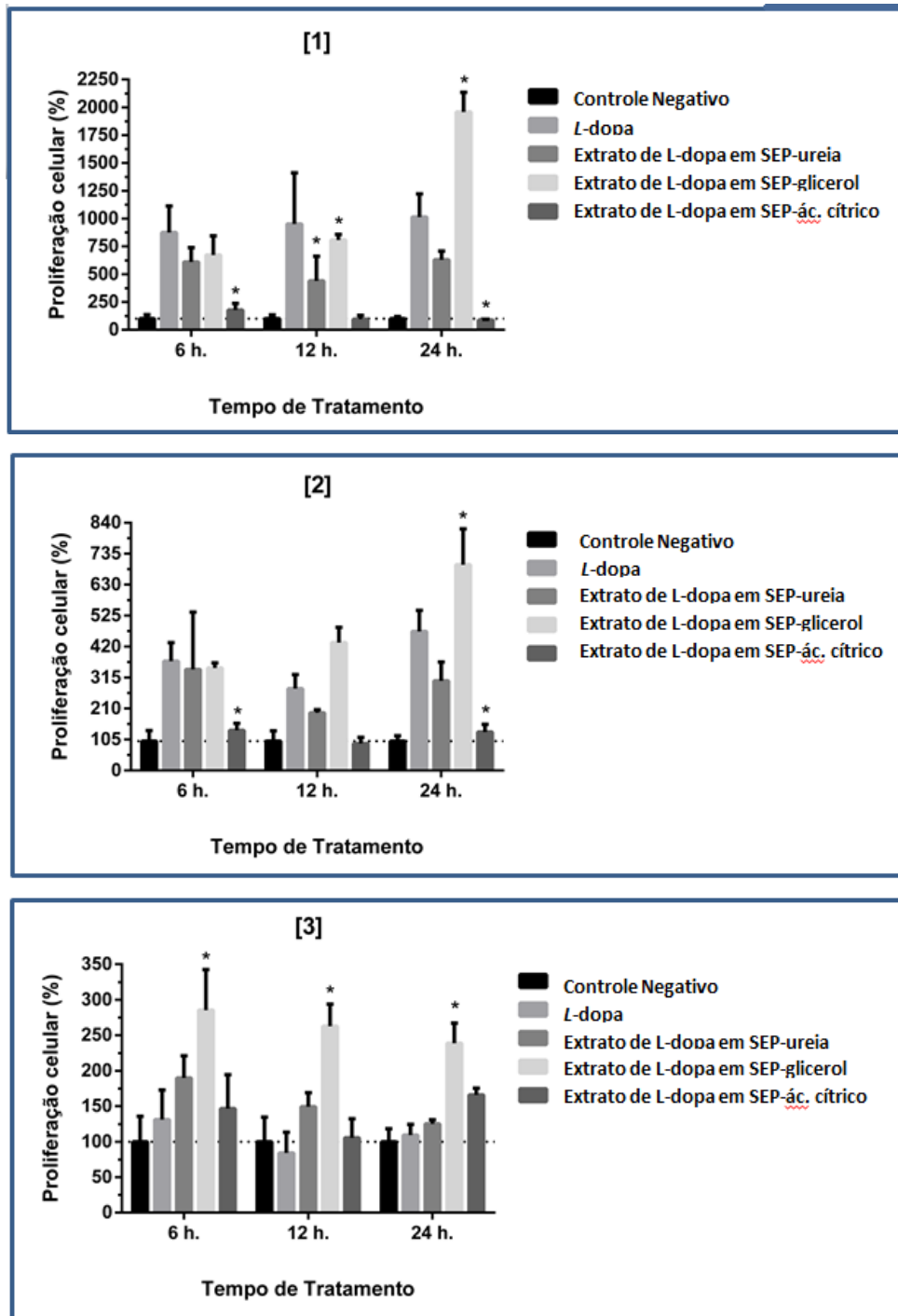
Os ensaios foram realizados com os extratos de *L*-dopa nos solventes SEP-ureia, SEP-ácido cítrico e SEP-glicerol e padrão de *L*-dopa em células HEK-293, como descrito no item 4.9.1. Por meio destes ensaios foram obtidos os resultados que estão organizados em um gráfico de barras, para melhor ilustração (Figura 16).
Figura 16 - Atividade proliferativa de cada composto nos tempos 6, 12 e 24 horas



Fonte: Mateus Gandra, 2019

A maior concentração de DMSO utilizada foi 2,5% que provocou redução na proliferação celular em relação ao controle negativo com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), considerando o controle negativo. Porém essa concentração não impediu a ação dos compostos, como observado no gráfico que expressa a ação da maior concentração.

Figura 17 - Atividade dos extratos de *L*-dopa em SEP nos tempos de 6, 12 e 24 horas.



Fonte: Mateus Gandra, 2019

As barras marcadas com asterisco possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao *L*-dopa em seu respectivo tempo de tratamento.

5.6.2.2 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

A eficiência da PCR em tempo real foi calculada através de gráficos onde os valores de Ct foram dispostos no eixo das ordenadas e os valores de cada diluição, no eixo das abscissas (Figura 22, anexo A8.2.3). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 39. O cálculo utiliza a equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Quando o *slope* se aproxima de -3,32, a PCR apresenta 100% de eficiência. O R^2 da equação de regressão foi calculado para cada gene com a finalidade de verificar a eficiência da reação.

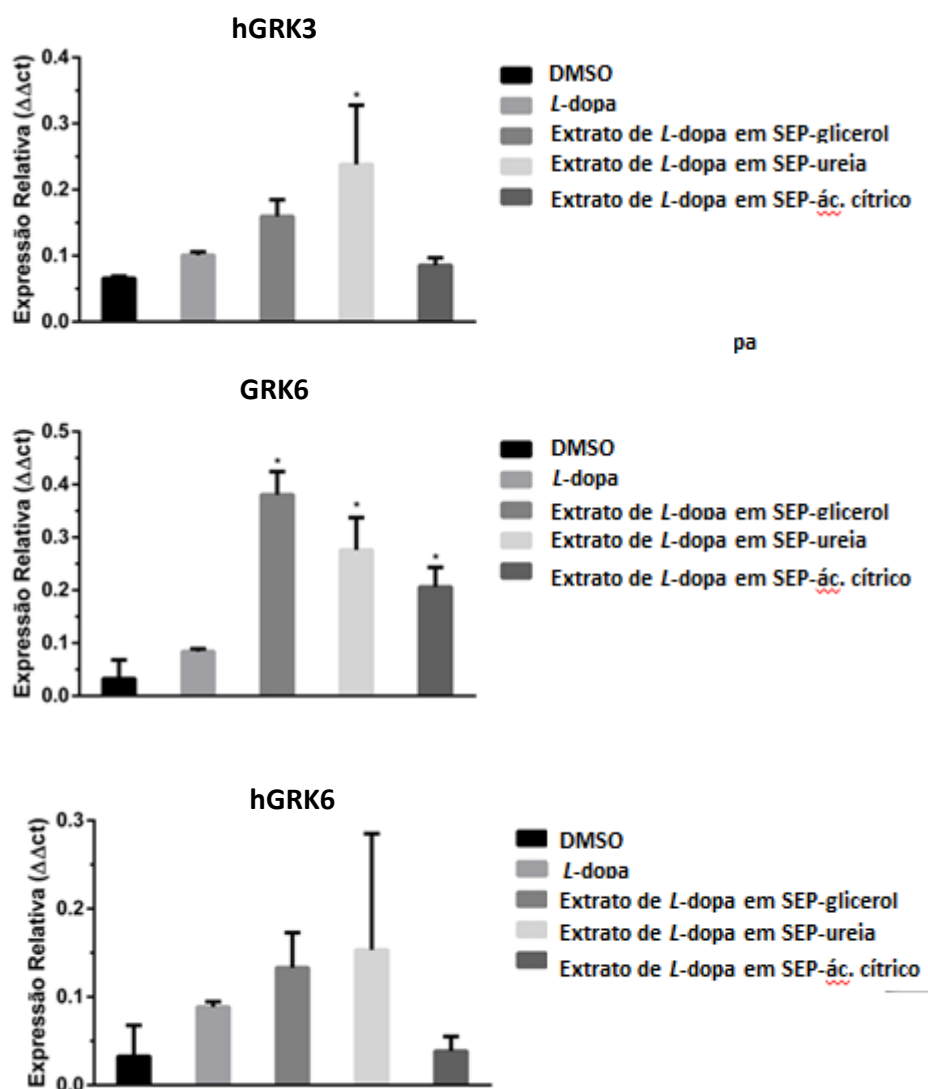
Tabela 39 - Eficiência de amplificação dos genes obtidas para as reações de PCR realizadas nesse estudo

Genes	Eficiência (%)
GADPH	86,74
β-Actina	97,98
hGRK3	68,20
GRK6	82,65
hGRK6	98,83

Os resultados obtidos da expressão relativa dos genes da via LID hGRK3, GRK6 e hGRK6 quando a cultura celular foi exposta ao DMSO, *L*-dopa e extrato de *L*-dopa nos SEP foram organizados em gráficos de barra, para melhor visualização (Figura 18). A cultura não exposta aos compostos foi utilizada como controle.

Resultados satisfatórios de ensaios deste tipo também foram descritos por MBOUS *et al* (2017) quando realizados com uma série de medicamentos como danazol, ácido benzoico e itraconazol. Os resultados mostraram um aumento de solubilidade em SEP de 5 a 22.000 vezes em comparação com a água. Além disso, MBOUS *et al*. (2017) realizaram um teste de solubilidade de algumas drogas em água, nos componentes puros dos SEP e nos próprios SEP em solução aquosa e verificaram que os medicamentos foram mais solúveis em solução de SEP. Estes resultados obtidos pelos pesquisadores implicam que a alta solubilidade dos fármacos é resultado do efeito sinérgico promovido pelo solvente eutético (MBOUS *et al*., 2017).

Figura 18 – Expressão relativa dos genes da via LID hGRK3, GRK6 e hGRK6 quando a cultura celular foi exposta ao DMSO, *L*-dopa, SEP-glicerol, SEP-ureia SEP-ácido cítrico.



Fonte: Mateus Gandra, 2019

O mesmo sinergismo foi observado nos ensaios bioquímicos realizados com a *L*-dopa. MBOUS *et al*, (2017) citam em seu artigo, uma patente onde descreve a capacidade dos SEP na estabilização e preservação de biomoléculas (Goldsborough e Bates, 2014). Nesta patente, foi relatada a capacidade dos SEP em estabilizar composições baseadas em proteínas de RNA/DNA e também células inteiras. O mesmo acontecimento foi observado nos ensaios bioquímicos realizados com os extratos de *L*-dopa em solução de SEP. Sendo assim, esta pesquisa realizada pelo nosso grupo, se mostra promissora no setor biomolecular e farmacêutico para que novas rotas para sintetizar medicamentos sejam desenvolvidas e

possam contribuir para a biodisponibilidade de medicamentos em fluidos biológicos. A solubilidade e estabilidade de outros medicamentos importantes em SEP também foi relatada por MOKHTARPOUR et al. (2020).

De acordo com os estudos realizados por CASSANI et al. (2016), nos extratos de *Mucuna* em meio alcóolico não foram detectados nenhum alcaloide prejudicial à saúde humana. Os autores afirmam a segurança do consumo de extratos de *Mucuna* a longo prazo e também que os sintomas do Mal de Parkinson são reduzidos, bem como a diminuição de efeitos colaterais quando comparada com formulações contendo o padrão de *L*-dopa em sua forma sintética.

O presente experimento, realizado por nosso grupo, também afirma a falta de periculosidade de extratos de *L*-dopa para células humanas. Neste caso, nos extratos contendo os SEP, a ação da *L*-dopa foi potencializada de forma considerável.

6 Considerações Finais

Ao longo deste trabalho foi observado que a semente de *Mucuna cinerea* (branca) apresenta concentração um pouco maior de *L*-dopa que a semente de *M. pruriens* (preta). As extrações foram realizadas com diversos solventes “verdes”, sendo os SEP os solventes que apresentaram melhor desempenho tanto em relação ao rendimento de extração, quanto na seletividade em extrair o composto de interesse. Tal seletividade pode ser explicada em relação à característica do tipo de solvente, ou seja, os SEP foram moldados de forma a oferecer maior interação de ligação de hidrogênio com a molécula de *L*-dopa.

Os experimentos realizados nos planejamentos estatísticos demonstraram que os fatores temperatura e tempo de extração quando combinados de forma crescente oferecem melhor eficiência de extração de *L*-dopa pelos SEP. Observou-se também que os SEP-glicerol e SEP-ácido cítrico foram capazes de extrair praticamente toda a *L*-dopa presente nas sementes analisadas quando aplicadas às condições de alta temperatura e tempo de extração, simultaneamente.

Foi possível obter extratos liofilizados de *L*-dopa em todos os SEP produzidos. A partir destes extratos foram realizados os ensaios biológicos sobre atividade antioxidante e influência da *L*-dopa como resposta de tratamento ao Mal de Parkinson.

A atividade antioxidante da *L*-dopa foi confirmada na execução do teste em DPPH. Os extratos apresentaram bons resultados, porém apresentaram maior decaimento com a diminuição das concentrações quando comparado com a atividade da *L*-dopa pura.

Com relação ao teste biológico de caráter bioquímico foi observado que os compostos contendo ácido cítrico não favoreceram a proliferação da linhagem HEK-293 e, por isso, não são considerados possíveis candidatos terapêuticos para o Mal de Parkinson. Em contrapartida, os compostos contendo SEP-glicerol foram os que apresentaram maior crescimento celular, sugerindo uma associação com genes relacionados à proliferação celular.

Os genes hGRK3, GRK6 e hGRK6 são inibidos em um quadro de LID. Os extratos contendo SEP-glicerol e SEP-ureia, não somente favoreceram uma maior proliferação celular em relação ao tratamento com *L*-dopa, como também apresentaram maior atividade. Concluiu-se que os extratos de *L*-dopa em SEP apresentaram um aumento favorável da resposta biológica ao serem utilizados, em relação ao tratamento com *L*-dopa pura, mesmo quando em concentrações muito maiores.

7 Referências

1. ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; MUNRO, H. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. **ChemComm Communication**, v. 19, p. 1, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1039/B106357J>.
2. ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **ChemComm Communication**, v. 20, p. 70-71, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
3. AHMED, M. R.; BYCHKOV, E.; GUREVICH, V. V.; BENOVIĆ, J. L.; GUREVICH, E. V. Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat basal ganglia is not normalized by *L*-dopa treatment. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 6, p. 1622-1636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05104.x>.
4. AHMED, M. R.; BYCHKOV, E.; LI, L.; GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. GRK3 suppresses *L*-DOPA-induced dyskinesia in the rat model of Parkinson's disease via its RGS homology domain. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10920, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10920>.

5. AL-SHEDDI, E. S.; AL-OQAIL, M. M.; SAQUIB, Q.; SIDDIQUI, M. A.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; FARSHORI, N. N. Novel all *trans*-retinoic acid derivatives: cytotoxicity, inhibition of cell cycle progression and induction of apoptosis in human cancer cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8181-8197, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20058181>.
6. ANDREU, N.; CHALÉ, J. J.; SENARD, J. M.; THALAMAS, C.; MONTASTRUC, J. L.; RASCOL, O. *L*-dopa-induced sedation: a double-blind cross-over controlled study versus triazolam and placebo in healthy volunteers. **Clinical Neuropharmacology**, v. 22, p. 15-23, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1097/00002826-199901000-00004>.
7. ALAÑÓN, M. E.; IVANOVIĆ, M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1685-1701, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.01.003>.
8. 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, p. 1097-1106, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.012>.
9. BALABANIAN, K.; LEVOYE, A.; KLEMM, L.; LAGANE, B.; HERMINE, O.; HARRIAGUE, J.; BALEUX, F.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; BACHELERIE, F. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 1074-1084, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI33187>.
10. BERGAMINI, M. F.; ZANONI, M. V. B. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 54-59, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.03.014>.

11. BISWAS, S.; MUKHERJEE, A.; MALLICK, U. K.; GHOSH, G.; DE, B. Antioxidant activity of *Mucuna pruriens* seeds, cultured callus and L-dopa. **Indian Drugs**, v. 47, n. 12, p. 22-25, 2010.
12. BUBALO, M. C.; CURKO, N.; TOMASEVIC, M.; GANIC, K. K.; REDOVNIKOVIC, I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159-166, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>.
13. CASSANI, E.; CILIA, R.; LAGUNA, J.; BARICHELLA, M.; CONTIN, M.; CEREDA, E.; ISAIAS, I. U.; SPARVOLI, F.; AKPALU, A.; BUDU, K. O.; SCARPA, M. T.; PEZZOLI, G. *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 365, p. 175-180, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.04.001>.
14. CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 225-239, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>.
15. DUANGNIN, N.; PHITAK, T.; POTHACHAROEN, P.; KONGTAWELERT, P. *In vitro* Investigation of *Mucuna pruriens* seed extracts to treat erectile dysfunction. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, p. 238-252, 2017. DOI: <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2018.0011>.
16. FAHN, S. How do you treat motor complications in Parkinson's disease: Medicine, surgery, or both? **Annals of Neurology**, v. 64, n. S2, p. S56-S64, 2008. DOI: 10.1002/ana.21453.
17. FERNANDES, B. J. D.; FILHO, A. S. A. Perfil farmacológico da picapona em pacientes com doença de Parkinson sob tratamento com Levodopa. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 1, p. 60-72, 2018.

18. FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, A. B.; GUALBERTO, S. A.; CORRAL, J. M. M.; FUJIWARA, R. T.; GUIMARÃES, P. H. G.; ALMEIDA, V. R. W. New naphthoquinones and an alkaloid with in vitro activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 450-457, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.09.003>.

19. FERREIRA, S. C.; VOROSHYLOVA, I. V.; FIGUEIREDO, N. M.; PEREIRA, C. M.; CORDEIRO, M. N. D. S. Computational and experimental study of propeline: A choline chloride based deep eutectic solvent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 298, n. 11, p. 197-208, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111978>

20. GOUVEIA, A. S. L.; OLIVEIRA, F. S. O.; KUMIA, K. A.; MARRUCHO, I. M. Deep eutectic solvents as azeotrope breakers: Liquid-Liquid extraction and COSMO-RS Prediction. **Sustainable Chemistry Engineering**, v. 4, p. 5640-5650, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01542>.

21. GUIGONI, C.; AUBERT, I.; LI, Q.; GUREVICH, V.; BENOVIĆ, J.; FERRY, S. Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p. S25-S29, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.11.005>.

22. GU, T.; ZHANG, M.; TAN, T.; CHEN, J.; LI, Z.; ZHANG, Q.; QIU, H. Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil. **Chemical Communication**, v. 50, p. 11749-11752, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4CC04661G>.

23. HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>.

24. HAN, X.; LI, W.; DUAN, Z.; MA, X.; FAN, D. Biocatalytic production of compound K in a deep eutectic solvent based on choline chloride using a substrate fed-batch

- strategy. **Bioresource Technology**, v. 305, p. 123-139, 2020
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123039>.
25. HANSEN, J.; BROSS, P. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. In: (Ed.). **Disease and Aging Concepts Protocols**: Springer, 2010. cap. Protein Misfolding and Cellular Stress, p.303-311. 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_21.
26. HASSLER, R. The pathology of paralysis agitans and post-encephalitic Parkinson's. **Journal fur Psychologie und Neurologie**, v. 48, n. 6, p. 387-476, 1938.
27. HU, G.; CHEN, L.; GUO, Y.; WANG, X.; SHAO, S. Selective determination of *L*-dopa in the presence of uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticle self-assembled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4711-4716, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.03.069>.
28. HU, Y.; CAI, T.; ZHANG, H.; CHEN, J.; LI, Z.; QIU, H. Poly(itaconic acid)-grafted silica stationary phase prepared in deep eutectic solvents and its unique performance in hydrophilic interaction chromatography. **Talanta**, v. 191, p. 265-271, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.072>.
29. HUISDEN, C. M.; SZABO, N. J.; ARRIOLA, K. G.; ADESOGAN, A. The effect of *Mucuna pruriens* detoxification through sonication and alkali or acid extraction, on *L*-dopa concentration and nutritional value. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 22, p. 45-53, 2019.
30. JOHNSON, S. L.; PARK, H. Y.; SILVA, N. A.; VATTEM, D. A.; MA, H.; SEERAM, N. P. 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, p. 1139, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10091139>.

31. KATZENSCHLAGER, R.; EVANS, A.; MANSON, A.; PATSALOS, P. N.; RATNARAJ, N.; WATT, H.; TIMMERMAN, L.; VAN DER GIESSEN, R.; LEES, A. J. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 75, p. 1672-1677, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028761>.

32. KHANDELWAL, S.; TAILOR, Y. K.; KUMAR, M. Deep eutectic solvents (DES) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 345-386, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.015>.

33. 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. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, article ID 840247, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/840247>.

34. LONGHI, J. G.; PEREZ, E.; LIMA, J. J.; CANDIDO, L. M. B. *In vitro* evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 535-544, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300011>.

35. LU, J. M.; LIN, P. H.; YAO, O.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840-860, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897>.

36. MARIA, P. D.; MAUGERI, Z. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of concept to emerging deep-eutectic-solvents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 220-225, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.008>.

37. MARTINS, H. F.; PINTO, D. P.; NASCIMENTO, V. A.; MARQUES, M. A. S.; AMEDOEIRA, F. C. Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS): application to a bioequivalence study. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 171-176, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.963>.
38. MBOUS, Y. P.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A.; LOOI, C. Y.; Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 105-134, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>.
39. MISRA, L.; WAGNER, H. Extraction of bioactive principles from *Mucuna pruriens* seeds. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 44, n. 1, p. 56-60, 2007.
40. MOGHIMI, M.; ROOSTA, A. Physical properties of aqueous mixtures of (choline chloride+glucose) deep eutectic solvents. **Journal Chemistry of Thermodynamics**, v. 129, n. 3, p. 159-165, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.09.029>.
41. MOHAPATRA, S.; GANGULY, P.; SINGH, R.; KATIYAR, C. K. Estimation of Levodopa in the unani drug *Mucuna pruriens* bak, and its marketed formulation by high-performance thin-layer chromatographic technique. **Journal of AOAC International**. v. 103, p. 22-27, 2020. DOI <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0288>.
42. MOKHTARPOUR, M., SHEKAARI, H., MOATTAR, M. T. Z., GOLCOUN, S. Solubility and solvation behavior of some drugs in choline based deep eutectic at different temperatures. **Journal of Molecular Liquids** v. 297, p 111-179, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111799>
43. MOURA, G. A. Quantificação de L-dopa nos extratos de *Mucuna pruriens* e *Mucuna cinerea*. Monografia apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, 2016.
44. MU, C.; ZHANG, Q.; WU, D.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q. Simultaneous quantification of catecholamines in rat brain by high-performance liquid chromatography with on-line gold nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence detection. **Biomedical**

- Chromatography**, v. 29, p. 148-155, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.3252>.
45. MULYONO, P.; AMARULLAH, G. M.; ARSADUDDIN, Z. Extraction of levodopa from *Mucuna pruriens* seed using water in fixed bed column. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, **Universitas Gadjah Mada. Internation Forum of Strategic Technology**, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1109/IFOST.2013.6616988>.
 46. PARMEZAN, S. N.; KLEIN, L.; OLIVEIRA, B. H.; BOVO, F.; PEREZ, E. Optimization of extraction of total phenolics compounds from seeds of *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 16, p. 34-39, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01756.x>.
 47. PELICIONI, P. H. S.; BRODIE, M. A.; LATT, M. D.; MENANT, J. C.; MENZ, H. B.; FUNG, V. S. C.; LORD, S. R. Head and trunk stability during gait before and after levodopa intake in Parkinson's disease subtypes. **Experimental Gerontology**, v. 111, p. 78-85, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.06.031>
 48. PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
 49. RADOSEVIC, K.; BUBALO, M. C.; SRCEK, V. G.; GRGAS, D.; DRAGIC~EVIC, T. L.; REDOVNIKOVIC, I. R. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. **Ecotoxicology Environment Safe**, v. 112, p. 46-53, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.
 50. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico EMBRAPA. p.4, 2007. http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf

51. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition: Cold spring harbor laboratory press**, p.132-141, New York 2001.

52. SAMPAIO, M. V. Visualização e classificação de características para a discriminação entre indivíduos saudáveis e com doença de Parkinson sob tratamento com Levodopa. Trabalho de conclusão de curso, **Universidade Federal de Uberlândia**, 2018.

53. SARDJONO, R. E.; KHOERUNNISA, F.; MUSTHOPA, I.; KHAIRUNISA, D.; SUGANDA, P. A.; RACHMAWATI, R. Synthesize of zinc nanoparticles using Indonesian velvet bean (*Mucuna pruriens*) extract and evaluate its potency in lowering catalepsy in mice. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 299, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/299/1/012080>.

54. SAVI, L. K. Desenvolvimento de solventes eutéticos profundos (NADES) e o estudo de suas propriedades físico-químicas, térmicas e reológicas. Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2019.

55. SINHA, S.; SHARMA, S.; VORA, J.; SHAH, H.; SRIVASTAVA, A. SHRIVASTAVA, N. *Mucuna pruriens* (L.) DC chemosensitize human breast cancer cells via downregulation of prolactin-mediated JAK2/STAT5A signaling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 23-35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.006>.

56. SHAFIE, M. H.; GAN, C. Y. Could choline chloride-citric acid monohydrate molar ratio in deep eutectic solvent affect structural, functional and antioxidant properties of pectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 835-843, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.013>.

57. SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DES) and their applications. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11060-11082, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.

58. STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 1997.
59. TELI, T.; MARKOVIC, D.; LEVINE, M. A.; HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1 α signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 474-490, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1210/me.2004-0275>.
60. TERMAN, G. W.; JIN, W.; CHEONG, Y. P.; LOWE, J.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J.; CHAVKIN, C. G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 55-64, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705595>.
61. VADIVEL, V.; JANARDHANAN, K. Nutritional and anti-nutritional composition of velvet bean: A lesser - known food legume in South India. **International Journal Food Science**, v. 51, n. 4, p. 279-287, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637480050077167>.
62. VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: (Ed.). *Cancer Cell Culture*: Springer, p. 237-245, 2011.
63. VIEIRA, V.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; COUTINHO, J. A. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; FERREIRA, O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops Products**, v. 115, p. 261-271, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.029>.
64. ZHANG, Q.; VIGIER, K. O.; ROYER, S.; JEROME, F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **The Royal Society of Chemistry**, Australia, 2012.
65. ZHANG, C.; STEINER, J. P.; HAMILTON, G. S.; HICKS, T. P.; POULTER, M. O. Regeneration of dopaminergic function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by

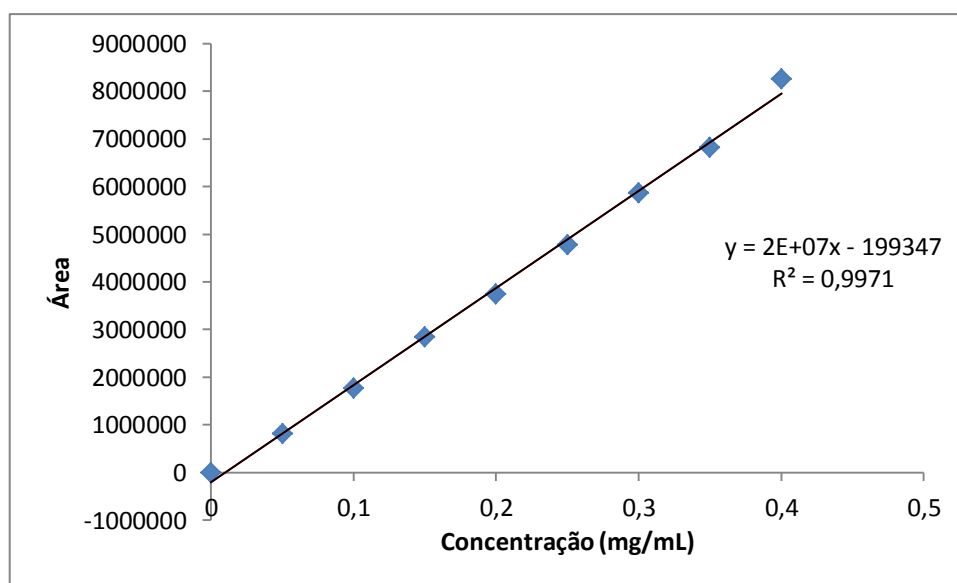
- neuroimmunophilin ligand treatment. **Journal Neuroscience**, **21**, RC156. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-j0002.2001>.
66. WANG, H.; MA, X.; CHENG, Q.; XI, X.; ZHANG, L. Deep Eutectic Solvent-Based microwave-assisted extraction of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Journal of Chemistry**, 2018 (Article ID 9579872). DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9579872>.
67. WOERNER, B. M.; LUO, J.; BROWN, K. R.; JACKSON, E.; DAHIYA, S. M.; MISCHER, P.; BENOVIĆ, J. L.; PIWNICA-WORMS, D.; RUBIN, J. B. Suppression of G-protein-coupled receptor kinase 3 expression is a feature of classical GBM that is required for maximal growth. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 156-166, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0411>.

APENDICE

A8.1. Curvas padrão de *L*-dopa

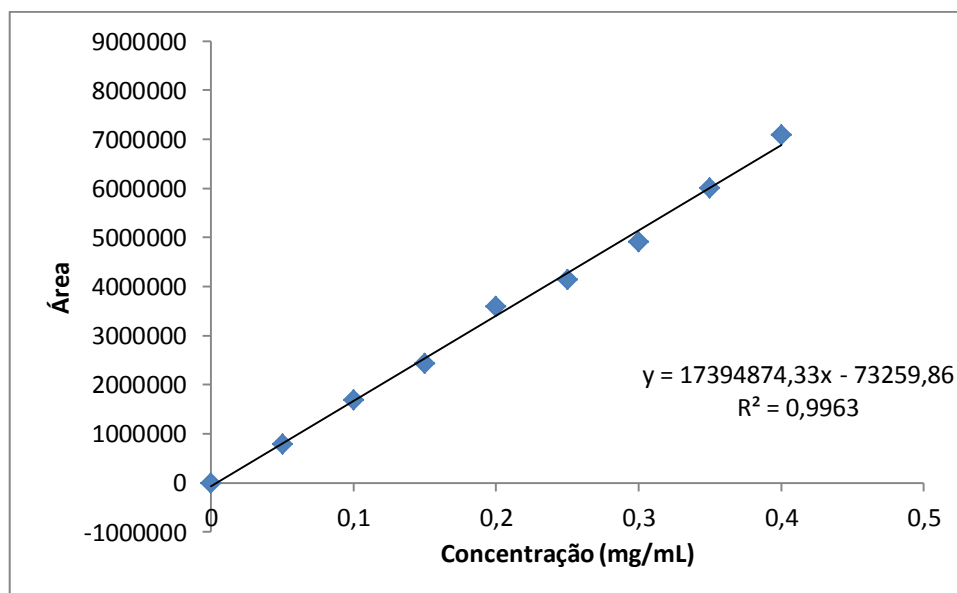
A8.1.1 Primeira curva padrão de *L*-dopa

Figura 19 - Primeira curva padrão da *L*-dopa.



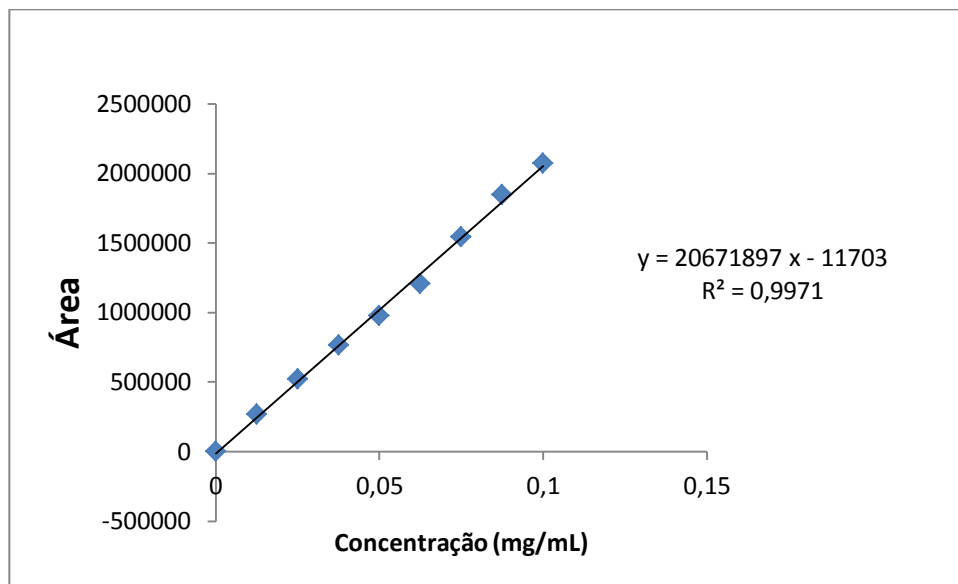
A8.1.2 Segunda curva padrão da *L*-dopa

Figura 20 - Segunda curva padrão da *L*-dopa.



A8.1.3 Terceira curva padrão da *L*-dopa

Figura 21- Terceira curva padrão da *L*-dopa.



A8.2. Ensaios biológicos

A8.2.1. Absorbâncias obtidas

Tabela 40 - Absorbâncias obtidas para a *L*-dopa, seus extratos em SEP e seus componentes e BHT.

Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>L</i> -dopa	Extrato Ureia	Extrato glicerol	Extrato ác. cítrico	BHT
1000	0,0805	0,0950	0,0755	0,0738	0,5901
	0,1099	0,1011	0,0804	0,0750	0,5907
	0,0777	0,0988	0,0757	0,0747	0,5899
500	0,0745	0,1254	0,0831	0,0806	0,5963
	0,0769	0,1187	0,0817	0,0822	0,5951
	0,0724	0,1297	0,0793	0,0867	0,5956
250	0,0748	0,2585	0,0959	0,0826	0,5985
	0,0735	0,1641	0,0941	0,0904	0,5989
	0,0753	0,1756	0,0915	0,1104	0,5979
125	0,0710	0,2145	0,1253	0,1065	0,6044
	0,0732	0,2666	0,1371	0,1267	0,6040
	0,0709	0,2742	0,1289	0,1426	0,6043
62,5	0,0716	0,4042	0,2041	0,1621	0,6052
	0,0842	0,4449	0,2430	0,2354	0,6049
	0,0737	0,4797	0,2069	0,2109	0,6055
Média					0,5989

Tabela 41 - Absorbâncias obtidas para os SEP, seus componentes e BHT.

Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cloreto colina	SEP glicerol	glicerol	SEP ác. cítrico	Ácido cítrico	SEP Ureia	Ureia
1000	0,5789	0,5788	0,5807	0,5825	0,5739	0,5781	0,5694
	0,5874	0,5806	0,5910	0,5852	0,5772	0,5841	0,5734
	0,5869	0,5811	0,5862	0,5773	0,5779	0,5758	0,5663
500	0,5874	0,5933	0,5914	0,5871	0,5765	0,5826	0,5862
	0,5969	0,5896	0,5954	0,5858	0,5782	0,5873	0,5837
	0,5882	0,5907	0,5895	0,5793	0,5790	0,5838	0,5772
250	0,5984	0,6009	0,5939	0,5910	0,5826	0,5870	0,5846
	0,6009	0,5958	0,5986	0,5840	0,5715	0,5859	0,5865
	0,5935	0,5940	0,5951	0,5830	0,5759	0,5860	0,5742
125	0,5905	0,5900	0,5995	0,5867	0,5810	0,5908	0,5896
	0,5989	0,5957	0,6035	0,5854	0,5765	0,5943	0,5897
	0,5980	0,6051	0,5972	0,5844	0,5803	0,5921	0,5821
62,5	0,5900	0,5991	0,6017	0,5857	0,5781	0,5896	0,5839
	0,6001	0,5965	0,6052	0,5774	0,5768	0,5888	0,5891
	0,5956	0,5978	0,6003	0,5802	0,5739	0,5851	0,5755

A8.2.2 Teste Proliferação celular em contato com *L*-dopa e seus extratos

Tabela 42 - Resultado da proliferação celular da *L*-dopa e dos compostos em três concentrações testadas e em 3 tempos diferentes. Os valores estão apresentados em percentual referente ao controle negativo (média $\pm$ desvio padrão).

	Concentração 1			Concentração 2			Concentração 3		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
Extrato Ureia	609,8 $\pm$ 130,5	439,2 $\pm$ 221,8	628,2 $\pm$ 79	342,7 $\pm$ 194,7	195,9 $\pm$ 10,54	304,5 $\pm$ 63,47	131,1 $\pm$ 41,78	84,21 $\pm$ 29,13	109,1 $\pm$ 15,2
Extrato Glicerol	672,7 $\pm$ 172,8	808 $\pm$ 49,07	1958 $\pm$ 176,7	347,6 $\pm$ 17,18	433,5 $\pm$ 52,08	697,3 $\pm$ 121,8	189,6 $\pm$ 31,24	149,3 $\pm$ 19,72	124,9 $\pm$ 6,02
Extrato ácido Cítrico	176,9 $\pm$ 60,55	94,83 $\pm$ 35,93	86,49 $\pm$ 8,02	136,5 $\pm$ 23,25	91,25 $\pm$ 21,29	130,9 $\pm$ 25,64	285,4 $\pm$ 56,98	262,7 $\pm$ 31,24	238,8 $\pm$ 28,32
L-dopa	874,2 $\pm$ 238,3	952 $\pm$ 458,3	1013 $\pm$ 208,1	370,7 $\pm$ 62,93	277,8 $\pm$ 47,64	471,3 $\pm$ 71,6	146,5 $\pm$ 47,83	105,5 $\pm$ 26,8	165,7 $\pm$ 9,672

A8.2.3 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

Figura 22 - A eficiência de proliferação de células em tempo real.

