

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA SCUSSEL FARIAS

**PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS, BIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE
L-DOPA DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Mucuna pruriens***

TOLEDO

2021

LETICIA SCUSSEL FARIAS

**PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS, BIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE
L-DOPA DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Mucuna pruriens***

**Pharmacological, biological and quantification properties of L-dopa from
Mucuna pruriens seed extract**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Cleverson Busso.

Coorientador(a): Gabrielle Caroline Peiter.

TOLEDO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LETICIA SCUSSEL FARIAS

**PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS, BIOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE
L-DOPA DO EXTRATO DE SEMENTES DE *Mucuna pruriens***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel de Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: Dezessete de dezembro de dois mil e vinte e um

Cleverson Busso
Doutor em Microbiologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Gabrielle Caroline Peiter
Mestre em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Priscila Vaz de Arruda
Doutora em Biotecnologia Industrial
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ricardo Fiori Zara
Doutor em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

TOLEDO

2021

Dedico aos meus pais, Raulique e Marlei, que me incentivaram e me proporcionaram o melhor que poderiam imaginar, por serem meu modelo e meu apoio desde sempre e aos meus irmãos, Isadora e Bruno, por serem os melhores para mim em todos os momentos desta trajetória. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela formação acadêmica pública e de qualidade, em especial ao Câmpus Toledo que proporcionou toda infraestrutura e apoio durante a graduação. Agradeço em especial aos Laboratórios Multiusuário Central Analítica, Microbiologia e Biologia molecular e suas equipes técnicas por permitirem a execução do trabalho proposto.

Aos meus pais, Raulique e Marlei, por me incentivarem ao longo destes anos e me proporcionar a conclusão deste curso de graduação com todo o apoio, paciência, presença, cuidado e muito amor. Aos meus irmãos, Isadora e Bruno por sempre estarem ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis que passamos neste período de pandemia, compartilhando os mesmos medos, mas sendo sempre um o apoio do outro. Agradeço também a todos os meus familiares e amigos que sempre torceram muito por nós. Amo todos vocês família Scussel e Farias!!!

Agradeço aos meus amigos de longa data que apesar da distância sempre estiveram presentes, vibrando a cada conquista e dando apoio a cada momento de insegurança, vocês são demais, minha segunda família e que com certeza sempre serão meu orgulho, amo vocês Grupo do Cantinho!!!

Aos meus futuros colegas de trabalho, que compartilharam essa caminhada desafiadora chamada de faculdade, estando presentes a cada madrugada não dormida, sempre sendo amigos, ouvintes e muitas vezes professores. Vocês foram essenciais nestes cinco anos, admiro todos vocês não apenas como amiga, mas como profissional, vocês são incríveis!!! Deixo meu agradecimento especial aos meus amigos: Letícia Beatriz, Gabriela, Diego, Tatiane, Arthur, Lucas, Alexandre, Alice, Leonardo e Adson por fazerem parte de diversos momentos ao meu lado nesta trajetória. Muito sucesso a todos nós, Engenheiros de Bioprocessos e Biotecnologia!!!

Agradeço aos professores, a equipe psicopedagógica e aos técnicos dos laboratórios que foram responsáveis pelo meu crescimento profissional, me incentivando e instruindo de forma receptiva sempre que preciso, muito obrigada a todos!!!

Agradeço em especial ao meu Professor Dr. Orientador Cleverson Busso que me guiou e acreditou no meu trabalho desde a iniciação científica, me ensinando e incentivando a cada dia, sempre serei grata por você despertar minha paixão por

pesquisa e me fazer acreditar que sou capaz de desenvolver cada dia mais. Muito obrigada prof!!!

Agradeço ao Professor Dr. Mário Henrique de Barros, USP - ICB, por me ceder as linhagens utilizadas no trabalho, além de me acolher em São Paulo como sua aluna, me ensinando e me incentivando neste trabalho.

Agradeço a Ma. Gabrielle Caroline Peiter que antes mesmo de ser minha co-orientadora me ensinava e me guiava no laboratório, sua paixão por ciência me encanta e me faz ter certeza de que podemos mudar o mundo com ela, agradeço por você ter aceitado o convite de fazer parte deste trabalho e de ter me apoiado desde o início, Muito obrigada Gabi!!!

Não poderia deixar de agradecer a você, Lorena, minha parceira de laboratório, futura mestre, que compartilhou seu trabalho, suas experiências, vivências, estudos, aprendizados e até os perrengues do dia a dia. Contigo aprendi tanto que não consigo nem mensurar em palavras, mas aqui deixo meu muito obrigada por fazer parte desta trajetória. Muita luz para nós!!!

A todos de modo geral: Muito obrigada a todas as palavras, ensinamentos, cuidado e receptividade, vocês foram essenciais nesta trajetória, desejo tudo de melhor que eu poderia desejar a mim, muito sucesso e luz para todos!!!

RESUMO

As plantas estão presentes na medicina há milhares de anos, tais como a *Mucuna* utilizada na medicina *Ayurveda* (tradicional da Índia) e indígena. A *Mucuna pruriens* é conhecida como fonte natural de L-dopa, um precursor direto do neurotransmissor dopamina, substância esta encontrada em baixos níveis em doenças como o Parkinson. Doenças neurodegenerativas são associadas ao envelhecimento, que por sua vez é catalisado pelo estresse oxidativo, acarretando disfunções metabólicas diversas no organismo. Uma forma de conter a ação desses compostos oxidativos é por meio da ação de compostos antioxidantes, sendo estes altamente encontrados nas plantas. Além de compostos antioxidantes, as plantas possuem uma série de metabólitos secundários, tais como flavonóides, taninos, alcalóides e outros que possuem ação farmacológica no metabolismo humano, sendo assim o reconhecimento desses pode ser benéfico para tratamentos diversos. Diante disso o presente estudo realizou um levantamento bibliográfico sobre o assunto, realizou procedimentos laboratoriais para obter o extrato de sementes de *M. pruriens*, quantificou a presença de L-dopa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC), avaliou a atividade antioxidante do extrato pelos métodos químicos: DPPH, ABTS e FRAP, além de avaliar sua atividade *in vivo* utilizando um sistema eucarioto unicelular por meio da linhagem mutante *Saccharomyces cerevisiae* Δ GTT1 e posteriormente a ação perante a linhagem *S. cerevisiae* PD1 que expressa a proteína alfa-sinucleína, responsável pela formação de agregados proteicos causadores da doença de *Parkinson*. Por meio das análises realizadas verificou-se que o extrato de sementes de *M. pruriens* possui alto potencial antioxidante, sendo este conferido pelos testes *in vitro* quando comparados a substâncias altamente antioxidantes utilizadas na indústria, assim como nos testes *in vivo*, onde observou-se o aumento significativo, à 95% de confiabilidade, da taxa de sobrevivência da linhagem após o desafio com o agente estressor Menadione, revelando sua capacidade antioxidante e de reparação frente a toxicidade da proteína alfa-sinucleína. Perante os testes de triagem fitoquímica observa-se como principais propriedades: antioxidante, antimicrobiano, reparação de tecidos, interação com membrana e formação de complexos. Com relação à cromatografia líquida de alta eficiência verificou-se que o extrato de sementes de *M. pruriens* obtido possui uma alta concentração de L-dopa em sua composição, sendo esta determinada em 156,19 g.L⁻¹ [g de L-dopa por litro de extrato de semente de *M. pruriens*]. Desta forma, conclui-se que o extrato de *M. pruriens* possui uma grande gama de compostos que podem ser utilizados para fins terapêuticos, assim como potencial substância coadjuvante no tratamento da doença de Parkinson.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Parkinson. Dopamina. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Plants have been present in medicine for thousands of years, such as *Mucuna* used in *Ayurveda* (traditional in India) and indigenous medicine. *Mucuna pruriens* is known as a natural source of L-dopa, a direct precursor of the neurotransmitter dopamine, a substance found at low levels in diseases such as Parkinson's. Neurodegenerative diseases are associated with aging, which in turn is catalyzed by oxidative stress, causing different metabolic disorders in the body. One way to contain the action of these oxidative compounds is through the action of antioxidant compounds, which are highly found in plants. In addition to antioxidant compounds, plants have a series of secondary metabolites, such as flavonoids, tannins, alkaloids and others that have pharmacological action on human metabolism, so their recognition can be beneficial for different treatments. Therefore, the present study carried out a literature review on the subject, performed laboratory procedures to obtain the extract of *M. pruriens* seeds, quantified the presence of L-dopa by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), evaluated the antioxidant activity of the extract by chemical methods: DPPH, ABTS and FRAP, in addition to evaluating its activity *in vivo* using a unicellular eukaryotic system through the mutant strain *Saccharomyces cerevisiae* Δ GTT1 and subsequently the action against the strain *S. cerevisiae* PD1 that expresses the alpha-synuclein protein, responsible for the formation of protein aggregates that cause Parkinson's disease. Through the analysis carried out, it was verified that the extract of seeds of *M. pruriens* has a high antioxidant potential, which is verified by *in vitro* tests when compared to highly antioxidant substances used in industry, as well as in *in vivo* tests, where the significant increase, at 95% reliability, in the survival rate of the strain after the challenge with the stressor agent Menadione, revealing its antioxidant and repair capacity against the toxicity of the alpha-synuclein protein. In the phytochemical screening tests, the main properties are: antioxidant, antimicrobial, tissue repair, membrane interaction and complex formation. In the face of high performance liquid chromatography, it was found that the extract of *M. pruriens* seeds obtained has a high concentration of L-dopa in its composition, which was determined at 156.19 g.L⁻¹ [g of L-dopa per liter of *M. pruriens* seed extract]. Thus, it is concluded that the extract of *M. pruriens* has a wide range of compounds that can be used for therapeutic purposes, as well as a potential supporting substance in the treatment of Parkinson's disease.

Keywords: Antioxidant activity. Parkinson. Dopamine. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - a) Planta b) Sementes de <i>Mucuna pruriens</i> (cinza)..... | 16 |
| Figura 2 - Estrutura química L-dopa..... | 22 |
| Figura 3 - Mecanismo de reação método DPPH..... | 25 |
| Figura 4 - Mecanismo de reação método ABTS..... | 26 |
| Figura 5 - Mecanismo de reação método FRAP..... | 26 |
| Figura 6 - Representação esquemática vetor recombinante pEG-SNCA..... | 32 |
| Figura 7 - Metodologia para realização dos tratamentos com linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 41 |
| Figura 8 - Resultados colorimétricos de metabólitos secundários via triagem fitoquímica: a) Saponinas; b) Esteróides e Triterpenóides; c) Alcalóides;..... | 43 |
| Figura 9 - Curva padrão de L-dopa por cromatografia líquida de alta eficiência à 280 nm..... | 46 |
| Figura 10 - Cromatograma Extrato de sementes de <i>M. pruriens</i> + Padrão L-dopa a) Cromatogramas sobrepostos b) Cromatogramas do Padrão a 0,05 g.L ⁻¹ ; Amostra de extrato de <i>Mucuna pruriens</i> à 0,25 g.L ⁻¹ , e Cromatograma Padrão 0,025 g.L ⁻¹ respectivamente..... | 47 |
| Figura 11 - Curva padrão de DPPH x Absorbância..... | 49 |
| Figura 12 - Tempo inicial (1 min) da reação DPPH-Extrato em a) 1 g.L ⁻¹ b) 10 g.L ⁻¹ c) 50 g.L ⁻¹ | 50 |
| Figura 13 - Curva cinética do método DPPH utilizando extrato de sementes de <i>Mucuna pruriens</i> | 51 |
| Figura 14 - Curva padrão de Trolox em reação com radical ABTS..... | 52 |
| Figura 15 - Coloração após 6 minutos de reação ABTS + amostra..... | 53 |
| Figura 16 - Curva de Sulfato Ferroso em reação com FRAP..... | 54 |
| Figura 17- Desafios com diferentes concentrações de Menadione..... | 56 |
| Figura 18 - Curva da taxa de sobrevivência da linhagem <i>S. cerevisiae</i> $\Delta GTT1$ a) Durante período de 24 horas b) Recorte dos tempos iniciais do tratamento.... | 57 |
| Figura 19 - Viabilidade celular da <i>S. cerevisiae</i> $\Delta GTT1$ após duas horas de tratamento..... | 58 |
| Figura 20 - Curva da taxa de sobrevivência da linhagem <i>S. cerevisiae</i> <i>PD1</i> a) Durante período de 24 horas b) Recorte dos tempos iniciais do tratamento.... | 60 |
| Figura 21- Viabilidade celular da <i>S. cerevisiae</i> <i>PD1</i> após duas horas de tratamento..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Solventes extratores correlacionados com metabólitos secundários | 18 |
| Tabela 2- Correlação de classes de metabólitos secundários..... | 20 |
| Tabela 3-Síntese de resultados de triagens fitoquímicas de sementes de..... | 21 |
| Tabela 4-Síntese de resultados de caracterização L-dopa por HPLC | 23 |
| Tabela 5- Síntese de resultados da atividade antioxidante de extratos de <i>M. pruriens</i> encontrados na literatura | 27 |
| Tabela 6- Síntese de resultados de diferentes avaliações de atividade antioxidante de diferentes substâncias utilizando modelo in vivo com <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| Tabela 7 - Descrição dos ensaios realizados utilizando linhagem de | 40 |
| Tabela 8-Síntese dos resultados obtidos na triagem fitoquímica..... | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| YNB | Yeast nitrogen base |
| YPD | Yeast extract, Peptone, Dextrose |
| YPGAL | Yeast extract, Peptone, Galactose |
| GAL | Galactose |
| DP | Doença de Parkinson |
| rpm | Rotações por minuto |
| <i>EPDA</i> | <i>European Parkinson's Disease Association</i> |
| <i>NPF</i> | <i>National Parkinson Foundation</i> |
| <i>PDF</i> | <i>Parkinson Disease Foundation</i> |
| µm | Micrômetro |
| nm | Nanômetro |
| mL | Mililitro |
| mg | Miligramas |
| BOD | Estufa incubadora (Demanda Bioquímica de Oxigênio) |
| OD | Densidade óptica |
| HCl | Ácido clorídrico |
| P.A | Para análise - (reagente de alto grau de pureza) |
| FeCl ₃ | Cloreto de ferro (III) |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pKa | Constante de acidez |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| ABTS | 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| °C | graus celsius |
| λ | <i>lambda</i> - Comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Objetivos específicos | 15 |
| 3. HIPÓTESES | 15 |
| 4. JUSTIFICATIVA | 15 |
| 5. REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 5.1 <i>Mucuna pruriens</i> | 16 |
| 5.2 Extratos de matéria vegetal | 17 |
| 5.3 Triagem fitoquímica do extrato de <i>Mucuna pruriens</i> | 18 |
| 5.4 Quantificação de L-dopa presente em extratos de <i>Mucuna pruriens</i> | 22 |
| 5.5 Atividade antioxidante do extrato de <i>M. pruriens</i> | 24 |
| 5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> | 25 |
| 5.5.2 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vivo</i> | 27 |
| 5.6 Doença de <i>Parkinson</i> e a proteína <i>alfa-sinucleína</i> | 30 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 6.1 Extração aquosa das sementes de <i>Mucuna pruriens</i> | 33 |
| 6.2 Triagem fitoquímica | 33 |
| 6.2.1 Saponinas - Índice de espuma | 34 |
| 6.2.2 Esteróides e Triterpenóides - Reação de Liebermann-Burchard | 34 |
| 6.2.3 Alcalóides - Reagente de <i>Dragendorff</i> | 34 |
| 6.2.4 Flavonóides - Teste de cianidina (<i>shinoda</i>) | 35 |
| 6.2.5 Taninos - Reação de precipitação com FeCl ₃ | 35 |
| 6.2.6 Antraquinonas - Reação de Bornträeger | 35 |
| 6.3 Quantificação de L-dopa por cromatografia líquida de alta eficiência | 36 |
| 6.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 36 |
| 6.4.1 DPPH | 36 |
| 6.4.2 ABTS | 37 |
| 6.4.3 FRAP | 38 |
| 6.5 Atividade antioxidante <i>in vivo</i> - Teste <i>in vivo</i> com linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ΔGTT1 | 39 |
| 6.5.1 Preparo do inóculo | 39 |
| 6.6 Atividade do extrato perante ação da proteína <i>alfa-sinucleína</i> - Teste <i>in vivo</i> com linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PD1 | 41 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.6.1 Preparo do inóculo | 41 |
| 6.6.2 Tratamentos com agente estressor (Menadione) | 42 |
| 6.7 Análise Estatística..... | 42 |
| 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 7.1 Triagem Fitoquímica | 43 |
| 7.2 Quantificação de L-dopa presente em extratos de <i>Mucuna pruriens</i>..... | 46 |
| 7.3 Atividade antioxidante do extrato de <i>Mucuna pruriens</i>..... | 49 |
| 7.3.1 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> | 49 |
| <u>7.3.1.1 DPPH</u> | <u>49</u> |
| <u>7.3.1.2 ABTS</u> | <u>52</u> |
| <u>7.3.1.3 FRAP</u> | <u>54</u> |
| 7.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vivo</i> | 55 |
| 7.4 Doença de <i>Parkinson</i> e a proteína <i>alfa-sinucleína</i> | 59 |
| 8. CONCLUSÃO | 62 |
| REFERÊNCIAS..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão presentes na medicina há milhares de anos, sendo base de sistemas sofisticados de medicinas tradicionais, onde originalmente eram utilizadas de forma empírica e atualmente transformadas em produtos formulados de valor agregado por meio de sua comprovação científica quanto à eficiência perante disfunções do organismo.

Diversos estudos revelam que além de propriedades antioxidantes, as plantas possuem uma vasta gama de metabólitos secundários, tais como flavonóides, alcalóides, taninos, saponinas e outros. Estes compostos são conhecidos por apresentarem propriedades farmacológicas e são utilizados isoladamente ou em forma de extratos e tinturas no tratamento de doenças ou de forma paliativa, tais como a morfina, atropina e vincristina, cujos componentes são alcalóides isolados de plantas (SAAD *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2016).

A *Mucuna pruriens* é uma planta trepadeira da família *Fabaceae* originária de climas tropicais, nativa da Índia e Antilhas presente em regiões da América Central e nas regiões tropicais da América do Sul (VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010). Esta planta é reconhecida por suas propriedades farmacológicas, estando presente na composição de mais de 200 formulações de drogas indígenas, além de ser utilizada na medicina *Ayurveda* (medicina tradicional da Índia) (VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010).

A importância do estudo das propriedades farmacológicas das sementes de *Mucuna* estão relacionadas a suas possíveis ações no sistema nervoso central, revelando-se fonte natural de L-dopa, um precursor direto do neurotransmissor dopamina, cujos níveis apresentam-se baixos em disfunções como na doença de *Parkinson* (LONGHI, 2007).

Doenças neurodegenerativas estão associadas ao envelhecimento, sendo este catalisado pelo excesso de oxidantes de forma constante, ou seja, cronicamente, acarretando o estresse oxidativo que por sua vez desencadeia diversas desestabilizações fisiológicas como a peroxidação oxidativa, dano oxidativo dos ácidos nucleicos, disfunção mitocondrial, oxidação de proteínas e outros efeitos que resultam em malefícios a saúde celular, desencadeando estresse oxidativo quando a defesa antioxidante não supre a demanda do organismo (BARREIROS *et al.*, 2006; DHANASEKARAN, 2008).

A ação de substâncias oxidantes pode ser evitada e reparada por meio de substâncias antioxidantes geradas de forma intracelular ou ingeridas exogenamente. Essas substâncias antioxidantes são altamente encontradas em plantas, tais como a *M. pruriens*, podendo ser administradas de forma medicamentosa e preventiva.

Sendo assim, reconhece-se a importância da prospecção de novas substâncias que atuem efetivamente em disfunções do organismo, tais como no sistema nervoso central devido ao fato da ascensão de doenças mundialmente, uma vez que muitas destas estão associadas ao envelhecimento catalisados por fatores externos da vida moderna, representando um grande problema na saúde pública mundial das próximas décadas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva-se a avaliar as propriedades e aplicações farmacológicas e biológicas do extrato de semente de *Mucuna pruriens*, bem como quantificar a presença de L-dopa no mesmo.

2.1 Objetivos específicos

- Obter o extrato aquoso por meio das sementes de *M. pruriens*;
- Realizar a triagem fitoquímica do extrato de *M. pruriens* obtido;
- Realizar a quantificação da substância de interesse: L-dopa por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar eficiência do extrato perante a proteína α -sinucleína.

3. HIPÓTESES

- O extrato de *M. pruriens* apresenta propriedades farmacológicas de interesse comercial;
- O extrato de *M. pruriens* possui em sua composição o L-dopa;
- Os testes de antioxidantes *in vitro* indicam resultados positivos do extrato de *M. pruriens*;
- O extrato apresenta recuperação da viabilidade celular expressiva perante atividade estressora induzida por Menadione;
- O extrato possui eficiência significativa perante a proteína α -sinucleína utilizada como estudo *in vivo*.

4. JUSTIFICATIVA

O extrato de *M. pruriens* é conhecido empiricamente por suas propriedades farmacológicas, desta forma reconhece-se a importância de identificar sistematicamente suas ações em organismos perante disfunções metabólicas do mesmo. Sendo assim, o presente trabalho justifica-se pela importância de prospectar novas substâncias que atuem efetivamente no metabolismo humano, sendo esta ação comprovada, a fim de colaborar com a sociedade diante a problemática da saúde pública mundial atual e das próximas décadas.

5. REFERENCIAL TEÓRICO

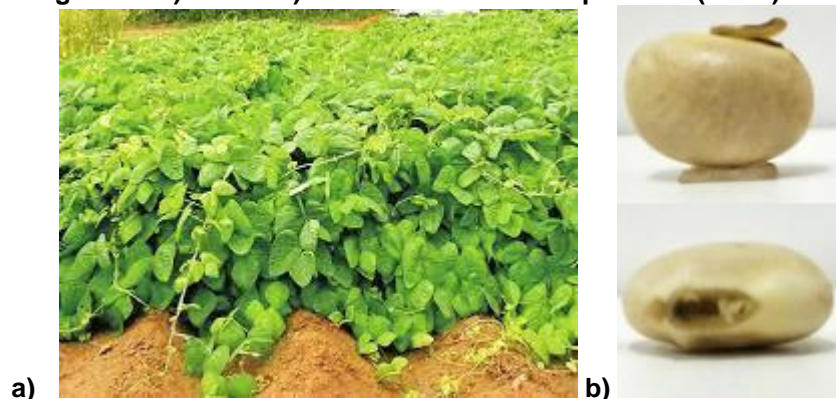
5.1 *Mucuna pruriens*

Mucuna pruriens é uma planta da família *Fabaceae* originária de climas tropicais, nativa da Índia e Antilhas presente em regiões da América Central e nas regiões tropicais da América do Sul, sendo popularmente conhecida como mucuna-anã e mucuna rajada no Brasil, *Velvet bean*, *Cowhage* e “*Atmagupta*” na Índia (VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010).

A *M. pruriens* é caracterizada como uma planta trepadeira, podendo esta chegar até 15 metros de altura, com folhas pontudas e ovaladas e com a presença de conjuntos de flores localizadas em sistemas de ramos, inflorescência, apresentando coloração roxa ou branca de aproximadamente 15 a 32 centímetros. Outro aspecto importante para sua identificação é a presença de vagens de aproximadamente 10 centímetros de comprimento, que possuem em torno de sete sementes (EMBRAPA, 2004; VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010).

As sementes, apresentam morfologia achatada, elipsóides e pequenas apresentando coloração cinza, marrom ou preta, sendo esta uma característica fenotípica importante para identificação das espécies de *Mucuna* (CÂNDIDO *et al.*, 2019; VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010). As características explanadas podem ser visualizadas nas Figuras 1a e 1b abaixo.

Figura 1 - a) Planta b) Sementes de *Mucuna pruriens* (cinza)



Fonte: EMBRAPA (2004) e CÂNDIDO *et al.* (2019).

No Brasil, espécies de *Mucuna spp.* são altamente utilizadas para adubação verde, silagem e em sistemas de rotação de culturas para reduzir os níveis

populacionais de nematoides, além de ser utilizada como fonte de proteína *in natura* na dieta do gado (CASTAÑEDA, 2015).

Sua grande aplicação e viabilidade ao agronegócio é justificada ao seu rápido desenvolvimento vegetativo, resistência à baixa disponibilidade hídrica e baixa fertilidade do solo viabilizando o cultivo em áreas degradadas e inutilizadas (LIMA *et al.*, 2012).

Ademais, na Índia as sementes de *M. pruriens* são utilizadas há mais de 4500 anos na medicina tradicional (*Ayurveda*) como tratamento de diabetes, hipertensão, doença de *Parkinson* e distúrbios sexuais, sendo esta considerada fonte natural de L-dopa, alcalóides e outros componentes de interesse farmacológico como o ácido gálico e estando presente na composição de mais de 200 formulações de drogas indígenas (LOPES *et al.*, 2012; ANDRADE, 2018).

Desta forma, evidencia-se a importância do estudo e utilização da planta *M. pruriens* como fonte alternativa para tratamentos diversos, assim como o reconhecimento das suas propriedades farmacológicas, objetivando-se a descoberta de drogas destinadas à medicina humana, além de proporcionar novas aplicações da matéria-prima em questão.

5.2 Extratos de matéria vegetal

Extratos são preparações de consistência líquida, semissólida ou sólida (seco) obtidas a partir de matéria vegetal utilizando-se de técnicas extrativas e solventes de acordo com o objetivo da extração. Os tipos de extração e preparo do material vegetal variam de acordo com as características físicas do material e físico-químicas do composto de interesse.

De forma geral os tipos de extração podem ser categorizados em: extração a frio (maceração, percolação, ultrassom e turbolização), extração a quente em sistema aberto (infusão e decocção) e extração a quente em sistema fechado (sob refluxo e em aparelho de *Soxhlet*). Perante ao preparo e padronização do material vegetal as técnicas aplicadas são diversas, tais como: secagem, moagem, pulverização, hidrólise, maceração e entre outros (SOUZA, 2016; SAAD, 2018).

A escolha do solvente extrator está correlacionada à dissolução do metabólito de interesse, sabe-se que as plantas possuem uma vasta diversidade de compostos secundários, resultando, portanto, na obtenção de uma matriz complexa para caracterização e purificação. Assim, a escolha do solvente, pH, temperatura e tempo

do processo são variáveis importantes a serem padronizadas e direcionadas para extrair as substâncias desejadas (SOARES, 2016).

Apesar da importância da padronização dos extratos vegetais, ainda não há uma metodologia oficial perante a Farmacopéia brasileira quanto a extração de *M. pruriens*. No entanto visto a notoriedade deste quesito diversos estudos correlacionam solventes extratores com grupos químicos de interesse presentes em plantas (SOARES, 2016), como pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 - Solventes extratores correlacionados com metabólitos secundários

| Solventes | Compostos preferencialmente extraídos |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pentano, hexano, éter de petróleo | Furanocumarinas, hidrocarbonetos, lipídeos, óleos essenciais, pigmentos, ceras |
| Tolueno, diclorometano, clorofórmio | Bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos, óleos fixos, ceras |
| Acetato de etila, n-butanol | Flavonóides, cumarinas simples, saponinas |
| Etanol, methanol | Heterosídeos em geral |
| Soluções hidroalcoólicas, água | Saponinas, taninos. |
| Soluções aquosas acidificadas | Alcalóides |
| Soluções aquosas alcalinizadas | Saponinas |

Fonte: Adaptado de SOARES et al. (2016).

Quanto maior a seletividade do solvente extrator mais direcionada será a obtenção das substâncias desejadas na extração, no entanto, outros pontos devem ser pontuados para a escolha do solvente, tais como custo e toxicidade, sendo estes definidos de acordo com a demanda, disponibilidade, destino e aplicação do extrato obtido, evidenciando a importância de tal estudo.

5.3 Triagem fitoquímica do extrato de *Mucuna pruriens*

As plantas possuem uma complexa mistura de moléculas bioativas provenientes do desenvolvimento de um sistema biossintético desenvolvido para

proteção contra patógenos e herbívoros, assim como para atração de outras espécies para cooperação sistêmica (alelopatia). O metabolismo celular das plantas, responsável pela biossíntese de substâncias, é dividido em primário e secundário (SAAD *et al.*, 2018).

O metabolismo primário origina moléculas como vitaminas, aminoácidos, carboidratos e clorofila, sendo estas relacionadas às funções essenciais. Já o metabolismo secundário é responsável pela síntese de substâncias de adaptação e defesa, ou seja, que possuem atividade biológica nos animais, podendo estas serem utilizadas em estudos fitoquímicos (grupos químicos) e de quimiosistemática (relações taxonômicas) (SAAD *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2016).

Sendo assim com o intuito de reconhecer os principais grupos químicos possuintes de atividades biológicas, grupos biologicamente ativos, diversos estudos surgiram com os avanços da química medicinal e de produtos naturais por meio de análises fitoquímicas, reconhecendo-os por meio de reações químicas por sua maioria qualitativos que resultam no aparecimento de cor e/ou precipitado (SOARES, 2016).

Desta forma, tem-se que os principais grupos químicos envolvidos no metabolismo secundário das plantas são: saponinas, esteróides e terpenóides, alcalóides, flavonóides, taninos, ácidos orgânicos, antraquinonas e aminoácidos essenciais.

Concomitante a estudos de reconhecimento dos grupos químicos resultantes do metabolismo secundário de plantas, ressaltou-se o interesse perante ao efeito biológico e potencial terapêutico dos mesmos. Sendo estes relatados na literatura relacionando-os com os grupos químicos constituintes das plantas, como pode ser visualizado na Tabela 2:

Tabela 2- Correlação de classes de metabólitos secundários relacionados com suas propriedades biológicas

| Classe | Definição e características | Propriedades biológicas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alcalóides | Aminas básicas | Estimulantes do sistema nervoso central, presentes na maioria dos fármacos, tais como morfina, atropina e vincristina. |
| Flavonóides | Polifenóis | Atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, pigmento natural e inibe danos do colágeno. |
| Saponinas | Glicosídeos | Propriedades detergentes e surfactantes, ação antioxidante, capacidade de se ligarem aos sais biliares e colesterol no tubo digestivo; ação contra células tumorais. |
| Taninos | Polifenólicos | Precursor de ácido gálico, um potente antioxidante |
| Esteróides | Cadeias de 28 a 29 átomos de carbono | Diminuição nos níveis de colesterol no sangue; redução nos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inibição e prevenção de tumores malignos |
| Compostos fenólicos (taninos, tocoferóis, ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, cumarinas) | Constituído por um anel aromático com um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. | Antioxidantes naturais, sendo capazes de interagir com espécies radicalares. |

Fonte: Adaptado de Saad *et al.* (2018) e Cunha *et al.* (2016).

Nwaoguikpe *et al.* (2011) realizou estudos fitoquímicos com sementes de *M. pruriens in natura* e cozidas, obtendo como resultados altas concentrações de metabólitos secundários nas amostras *in natura* e redução das concentrações de flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos, cianeto de hidrogênio, fenóis e fitato nas amostras que foram realizado tratamento térmico.

Ifemeje (2016) relatou em seus estudos que há presença majoritária de oxalato, taninos e saponinas nas amostras de sementes de *M. pruriens*, sendo estes seguidos por flavonóides e alcalóides. Ainda segundo esse autor, obteve-se como resultados uma baixa concentração de glicosídeos cianogênicos, substâncias estas que apresentam alta toxicidade em grandes concentrações.

Tavares *et al.* (2016) também avaliou a composição nutricional, fitoquímica e microbiológica desta planta cultivada no nordeste brasileiro, apresentando resultados positivos para a presença de flavonóides e baixa concentração de saponinas e esteróides, e para os demais metabólitos estudados apresentaram-se ausentes.

Em síntese, estudos relatam em sua maioria a presença de saponinas, flavonóides e taninos em sementes da planta em questão, como pode ser visualizado na Tabela 3, com as respectivas concentrações de cada metabólito.

Tabela 3-Síntese de resultados de triagens fitoquímicas de sementes de *M. pruriens* presentes na literatura

| Composto | Concentração | Referência |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Flavonóides | 0,42±0,02 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| | Presença moderada | TAVARES <i>et al.</i> (2016) |
| | 0,00286±0,02 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| Esteróides | Presença baixa | TAVARES <i>et al.</i> (2016) |
| | 0,47±0,02 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| Saponinas | Presença baixa | TAVARES <i>et al.</i> (2016) |
| | 0,00350±0,03 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| | 0,28±0,00 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| Taninos | 0,00325±0,06 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| | 1,07±0,01 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| Alcalóides | 0,00267±0,01 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| | 2,82±0,01 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| Oxalato | 0,0050±0,05 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| Fitatos | 0,0010±0,17 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |
| Glicosídeos cianogênicos (HCN) | 12,69±0,01 % (m/m) | NWAOGUIKPE <i>et al.</i> (2011) |
| | 0,00002±0,06 % (m/m) | IFEMEJE (2016) |

Fonte: Autoria própria (2021).

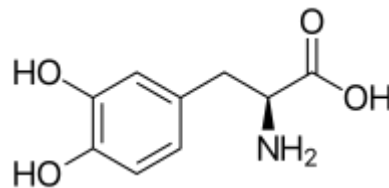
A presença de metabólitos secundários tóxicos para ingestão humana foram identificados nas sementes e relatados na literatura, tais como a presença de cianeto de hidrogênio e oxalato indicados por Nwaoguikpe *et al.* (2011) e Ifemeje (2016). Tendo em vista sua possível absorção pelo organismo humano é necessário o tratamento prévio térmico quando utilizados para alimentação em forma de farinhas, sementes, frutos e entre outras, para que não ocorra intoxicação do organismo.

A identificação dos compostos citados apresenta grande importância para o reconhecimento de propriedades farmacológicas, como visto anteriormente, assim como a investigação de particularidades e tratamentos específicos para cada amostra de estudo, além de potencializar seu poder econômico e viabilização para comercialização.

5.4 Quantificação de L-dopa presente em extratos de *Mucuna pruriens*

A *M. pruriens* é caracterizada por ser fonte natural de L-dopa (Figura 2), precursor direto do neurotransmissor dopamina. Esta molécula é utilizada como droga medicamentosa no tratamento de doenças como *Parkinson*, cuja fisiopatologia é caracterizada pela diminuição de dopamina e desta forma apresenta-se como atividade neuroprotetora em estudos correlacionados (JURI; CHANÁ, 2006).

Figura 2 - Estrutura química L-dopa



Fonte: MOURA *et al.* (2018).

Uma vez que a dopamina administrada não possui capacidade de permear a barreira hematoencefálica, tratamentos com precursores de sua via metabólica, como a L-dopa, são a opção de muitos tratamentos utilizados atualmente com o intuito de que estas atravessem a barreira e assim atinjam o sistema nervoso central, onde são convertidas em dopamina, pela ação de enzimas L-aminoácidos aromáticos descarboxilase (AADC) (LONGHI, 2007).

Diante de suas características e aplicações farmacológicas a obtenção de L-dopa de diversas fontes tornou-se alvo de estudos, apresentando resultados positivos

perante a doença de *Parkinson* em modelos animais. Estudos como os de Lieu *et al.* (2010) observaram que tratamentos administrados com L-dopa naturalmente extraída diretamente da planta produziram resultados melhores quando comparados com a droga sintética.

Sendo assim, concomitante aos estudos farmacológicos, visando a caracterização e quantificação de L-dopa, em diferentes fontes de obtenção natural, a utilização de técnicas de cromatografia tornaram-se essenciais para garantir a qualidade do processo extrativo e demais formas de obtenção da L-dopa.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) é caracterizada pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas do que as cromatografias líquidas clássicas, com diâmetro interno de 2-5 mm, com empacotamento de partículas 3-10 μm , que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão com um fluxo controlado, permitindo análises rápidas e elevada eficiência na separação (ARAGÃO *et al.* 2009).

Segundo estes autores, a eficiência da separação e quantificação é definida pela seletividade, linearidade, robustez, precisão e exatidão da metodologia empregada. Diante disso diversos métodos com diferentes fases móveis são empregados para diferentes tipos de substâncias, de acordo com a polaridade, ponto isoelétrico, pKa e outras características (ARAGÃO *et al.* 2009).

Com o intuito de utilizar metodologias baseadas na literatura para separação de L-dopa no extrato de sementes de *M. pruriens*, realizou-se uma síntese de condições de operação do equipamento e resultados encontrados na caracterização desta molécula por HPLC em coluna C18, como pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4-Síntese de resultados de caracterização L-dopa por HPLC

| Matriz | Fase móvel | $\lambda(\text{nm})$ | Tempo de Retenção | Conc. L-dopa | Referência |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-------------------|--------------|---------------|
| Extrato aquoso acidificado de <i>M. pruriens</i> | Isocrático - metanol:água (20:80 v/v) | 282 | 4,5 min | 120 mg/g | LONGHI (2007) |
| Extrato etanólico de <i>M. pruriens</i> | Isocrático - metanol:água (20:80 v/v) | 282 | 4,5 min | 13,51 mg/g | LONGHI (2007) |
| Extração ácida exaustiva de <i>M. pruriens</i> | Isocrático - 20 % metanol:água | 282 | 3,5 min | 4,20 % | PEREZ (2009) |

Fonte: Autoria própria (2021).

Diante do exposto nota-se que a eluição em sistema isocrático com fase móvel metanol:água (20:80 v/v) é adotada na maioria dos trabalhos, sendo que o tempo de retenção onde L-dopa é identificado em comprimento de onda de 282 nm varia em função dos tipos de extração empregada no material.

5.5 Atividade antioxidante do extrato de *M. pruriens*

O excesso de oxidantes em organismos vivos gera diversas desestabilizações fisiológicas como a peroxidação oxidativa, dano oxidativo em ácidos nucleicos, disfunção mitocondrial, oxidação de proteínas e outros efeitos que resultam em malefícios a saúde celular, desencadeando estresse oxidativo quando a defesa antioxidante não supre a demanda do organismo (DORNAS *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo em constante ação pode tornar-se crônico, gerando desequilíbrio ao organismo, desenvolvendo problemas como envelhecimento precoce, tumores e doenças neurodegenerativas como *Parkinson* e *Alzheimer* (BARREIROS *et al.*, 2006).

Embora as causas de doenças neurodegenerativas, como o *Parkinson*, não sejam bem compreendidas, sabe-se que um dos mecanismos mais comuns na degeneração de neurônios dopaminérgicos é pela ação de neurotoxinas mediadas pelo estresse oxidativo, devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, atuando por sua vez no metabolismo oxidativo da dopamina (DHANASEKARAN, 2008).

A ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser evitada e reparada por meio de substâncias antioxidantes geradas de forma intracelular ou ingeridas exogenamente. A capacidade antioxidante de um composto se dá por sua capacidade de doar elétrons para outra molécula (radical livre) possibilitando que esta se estabilize (DORNAS *et al.*, 2007).

Um exemplo, altamente utilizado para o tratamento da doença de *Parkinson* é a *L-dopa*, conhecida como padrão ouro para o tratamento sintomático. No entanto, a *L-dopa* sintética causa vários efeitos colaterais aos pacientes, sendo a discinesia um dos mais sérios. Portanto estudos de prospecção de fontes naturais, tais como as sementes de *M. pruriens* vem sendo investigados como uma nova alternativa para tratamentos não tóxicos e seguros para administração humana via oral (DHANASEKARAN, 2008; ANDRADE, 2018).

Estudos ainda revelam que a administração de *M. pruriens* no tratamento em modelos animais mostraram-se de 2 a 3 vezes mais eficientes que a L-dopa sintética perante ao controle de sintomas motores, apresentando neuroproteção e restauração de níveis de dopamina na substância nigra e norepinefrina no trato nigroestriatal de um modelos animais parkinsonianos (ANDRADE, 2018).

Sendo assim se reconhece a importância de avaliar a capacidade antioxidante do extrato de *M. pruriens*, a fim de avaliar a capacidade de redução dos níveis de radicais livres que possam auxiliar no processo natural celular antioxidante.

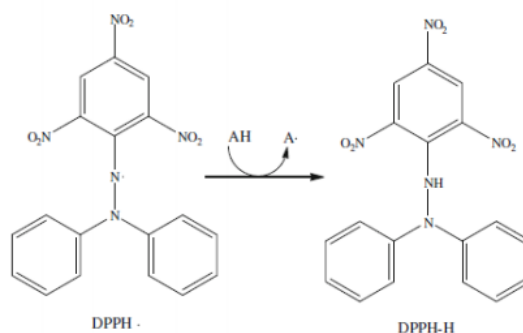
5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Diversos métodos para avaliação antioxidante *in vitro* são conhecidos e empregados atualmente, sendo estes caracterizados por quantificarem essa capacidade de substâncias frente a substâncias cromógenas de natureza radical, destacando-se pela mudança de coloração proporcional a atividade da substância.

Os métodos mais utilizados são o ABTS, DPPH e FRAP, devido aos seus diferentes mecanismos reacionais os métodos não devem ser utilizados de forma comparativa entre si, mas sim entre ensaios com mesmo método e utilizados como “contra-provas” a fim de estimar a capacidade antioxidante em diferentes tipos de reações radiculares.

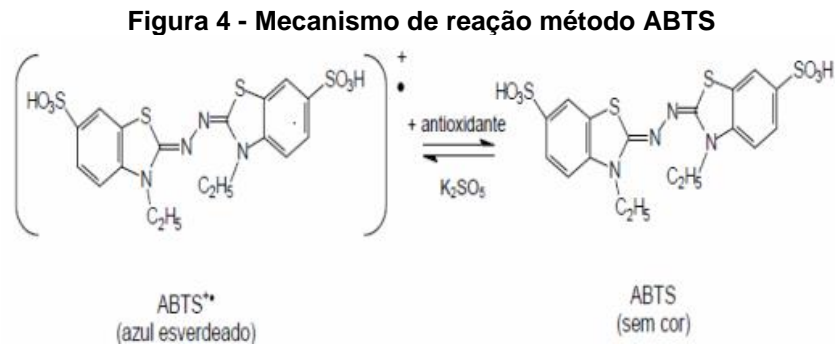
O método DPPH mensura a capacidade antioxidante de uma substância por meio de sua capacidade de reduzir o radical livre DPPH à hidrazina, por meio da ação de uma substância antioxidante, que age como doador de átomos de hidrogênio, alterando assim a coloração violeta, característica do DPPH, para amarelo, como pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 - Mecanismo de reação método DPPH



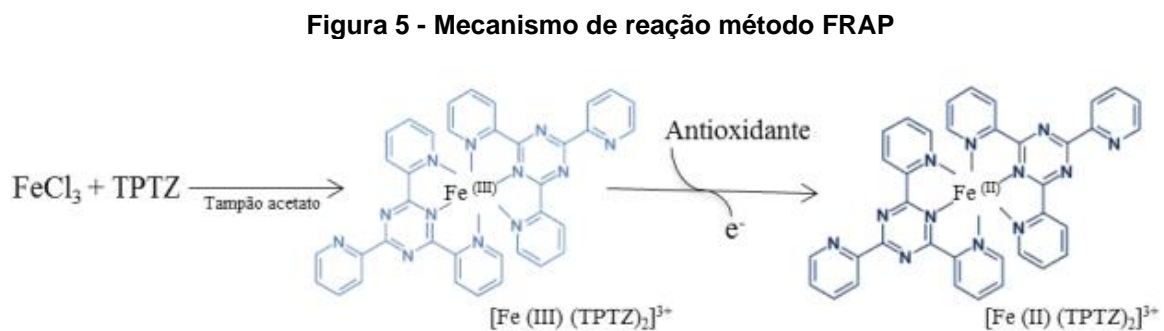
Fonte: RABELO (2014).

O método ABTS, baseia-se na geração do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio, a adição da substância antioxidante reduz o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS, como pode ser observado na Figura 4, ocasionando a perda da coloração do meio reacional.



Fonte: SOUZA (2013).

No método FRAP, o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPTZ), como pode ser visualizado na Figura 5, na presença de uma substância antioxidante e em condições ácidas, este mecanismo reacional é caracterizado pela formação de uma coloração azul intensa, quanto mais intensa a cor maior a capacidade antioxidante.



Fonte: URREA-VICTORIA *et al.* (2016).

Diante dos diferentes mecanismos de ação citados, estudos utilizando extratos de *M. pruriens* relatam sua ação antioxidante em diferentes tipos de extração e solventes utilizados, podendo-se visualizar os resultados principais obtidos na Tabela 5.

Tabela 5- Síntese de resultados da atividade antioxidante de extratos de *M. pruriens* encontrados na literatura

| Método | Tipo de extrato | Resultado (extrato) | Resultado (controle) | Referência |
|--------|--------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| DPPH | Metanólico | 13,2±1,2 mg.L ⁻¹ | 4,14±0,57 mg.L ⁻¹ (Vitamina E) | MOTTA <i>et al.</i> (2013) |
| | Hexano | 67,60 mg.L ⁻¹ | - | GONÇALVES <i>et al.</i> (2011) |
| | Diclorometano | 57,28 mg.L ⁻¹ | - | |
| | Aquoso acidificado | 0,035 g.L ⁻¹ | 0,26 g.L ⁻¹ (Vitamina E) | LONGHI (2007) |
| | Acetato de etila | 420 mg.L ⁻¹ | 480 mg.L ⁻¹ (Rutina) | KUMAR <i>et al.</i> (2010) |
| ABTS | Aquoso | 58 % atividade antioxidante | 37 % ativ. antiox. (Rutina) | JIMOH <i>et al.</i> (2020) |
| | Aquoso acidificado | 12,71µM Trolox.g ⁻¹ | 45,43 µM (Trolox) | LONGHI (2007) |
| | Aquoso | 68 % atividade antioxidante | 30 % ativ. antiox. (Rutina) | JIMOH <i>et al.</i> (2020) |
| FRAP | Aquoso | 8,68 mg.g ⁻¹ Fe ²⁺ | 9,84 mg.g ⁻¹ Fe ²⁺ (Rutina) | JIMOH <i>et al.</i> (2020) |

Fonte: Autoria própria (2021).

Diante do exposto, vê-se que os extratos aquosos de *M. pruriens* possuem alta atividade antioxidante quando comparada aos controles utilizados, ressalta-se ainda, no estudo de Jimoh *et al.* (2020) que até mesmo em baixas concentrações (0,0025 g.L⁻¹ e 0,005 g.L⁻¹) o extrato aquoso de *M. pruriens* demonstrou capacidade antioxidante superior ao controle (Rutina) nos testes *in vitro* utilizando-se DPPH e ABTS e apresentaram-se positivos com pouca variabilidade nos testes utilizando-se o método FRAP.

5.5.2 Avaliação da capacidade antioxidante *in vivo*

Embora os testes químicos sejam em sua maioria representativos em face ao mecanismo de ação de substâncias antioxidantes perante os radicais livres, nem sempre os resultados obtidos *in vitro* equivalem aos obtidos em modelos animais (*in vivo*). No entanto, a execução desses ensaios requer um número significativo de

animais disponíveis, além de serem de difícil execução, alto custo e complexidade metabólica, além do requerimento e análise por comitê de ética (SOARES, 2005).

Desta forma, a fim de estudar um modelo mais próximo ao real, a utilização de sistemas eucarióticos unicelulares, como o da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta uma alternativa para o estudo das substâncias em condições celulares.

A levedura *S. cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados como modelo de estudo de outros organismos e suas interações, devido sua fácil manipulação, similaridade e genoma bem caracterizado (MONTEIRO, 2006). Diante dessas características a utilização desta levedura, para a obtenção de mutantes torna-se viável e almejado para o estudo *in vivo*.

Normalmente, para estes estudos são empregados microrganismos geneticamente modificados, a fim de avaliar propriedades de interesse tais como: expressão proteica e deleção gênica. O gene *GTT1*, por exemplo, é responsável pela produção da proteína endógena *Glutathione S-transferase (GST)*, caracterizada por sua ação detoxificante, capaz de combater radicais livres xenobióticos e intracelulares, portanto, sua deleção favorece o ataque de radicais livres ocasionando estresse oxidativo e gerando danos a célula, possibilitando o estudo de substância potencialmente antioxidantes.

Concomitante a linhagem mutante, a literatura também reporta o uso de agentes estressores para tal avaliação, como por exemplo o Menadione (vitamina K3), um composto orgânico com propriedades citotóxicas, conhecida pela indução de apoptose, morte celular. Alguns estudos constataam que esta substância afeta diretamente funções mitocondriais de células, sendo, portanto, um potente indutor de estresse oxidativo em altas dosagens (I LAUX; A NEL, 2001).

Apesar da literatura apresentar estudos da atividade antioxidante de extratos de *Mucuna pruriens in vitro* e em modelos animais, o mesmo não ocorre com modelos *in vivo* utilizando a linhagem de *S. cerevisiae*. No entanto trata-se de uma prática versátil e que já foi utilizada para outros extratos e compostos diversos, evidenciando sua eficiência, como no caso de Ferracini-Santos, 2009, conforme ilustra a Tabela 6.

Tabela 6- Síntese de resultados de diferentes avaliações de atividade antioxidante de diferentes substâncias utilizando modelo *in vivo* com *S. cerevisiae*

| Linagem | Agente estressor | Substância | Resultado % sobreviventes | Referência |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> XV185-14C | Alcalóide isoquinolínico apomorfina (APO) à 0,2 mM | Apomorfina (APO) (controle) | 24,30 ± 4,80 | SOARES <i>et al.</i> (2005) |
| | | Vitamina E + APO | 50,80 ± 0,85 | |
| | | Rutina + APO | 82,50 ± 0,14 | |
| | | Vitamina C + APO | 34,35 ± 1,92 | |
| | | Vit. C + Vit E + APO | 30,10 ± 2,78 | |
| | | Naringenina + APO | 56,30 ± 6,25 | |
| | | Naringina + APO | 70,80 ± 2,20 | |
| | | Quercetina + APO | 75,60 ± 3,81 | |
| | | Sakuranetina + APO | 77,30 ± 1,41 | |
| | | Hesperidina + APO | 79,50 ± 1,86 | |
| <i>S.cerevisiae</i> XV185-14C | Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) à 50mM | H ₂ O ₂ (controle) | 44,50 ± 3,54 | MEDINA (2009) |
| | | Extrato aquoso amarelado (AR27) + H ₂ O ₂ | 85,65 ± 3,32 | |
| | | Araçá aquoso avermelhado (AR9) + H ₂ O ₂ | 82,00 ± 5,66 | |
| <i>S.cerevisiae</i> | Paraquat (1,1'-dimetil - 4,4'-bipiridílio) | Paraquat 10 mM | 39,4 | GUARIENT I <i>et al.</i> (2010) |
| | | Paraquat 15 mM | 17,1 | |
| | | Spirulina + Paraquat 10 mM | 54,8 | |
| | | Spirulina + Paraquat 15 mM | 57,8 | |

Fonte: Autoria própria (2021).

Por meio dos estudos apresentados na Tabela acima, Soares *et al.* (2005) concluiu por meio das análises estatísticas que a vitamina C e a mistura das vitaminas C e E não obtiveram diferenças estatisticamente significativas perante ao controle com apomorfina. Já os flavonóides rutina, hesperidina, sakuranetina, quercetina e naringina apresentaram diferença significativa, demonstrando assim quais são as substâncias de maiores efeitos antioxidantes do estudo em questão, sendo estes seguidos da naringenina e vitamina E.

Guarienti *et al.* (2010) concluiu em seu estudo que a Spirulina foi capaz de proteger as células da levedura dos danos oxidativos causados pelo agente estressor paraquat, apresentando diferença estatística do controle em ambas as concentrações testadas, demonstrando também que a atividade da Spirulina foi mais pronunciada quando se utilizou a concentração 15 mM de paraquat.

No estudo de Medina (2009) os extratos de araquá obtiveram diferença estatística do controle com o agente estressor, demonstrando-se eficazes na proteção aos danos causados pelo peróxido de hidrogênio, concluindo-se uma importante capacidade antioxidante desses extratos. Sendo assim, os estudos apresentados relatam a versatilidade e eficiência da *S. cerevisiae* para a realização de estudos *in vivo*.

5.6 Doença de *Parkinson* e a proteína *alfa-sinucleína*

As doenças neurodegenerativas em geral são caracterizadas pela disfunção e morte de neurônios no cérebro e/ou medula espinhal, sendo estas associadas com o envelhecimento, levando em última instância a problemas motores, cognitivos e/ou demência. Sendo assim, essas doenças representam um problema em ascensão para a saúde pública mundial nas próximas décadas (SEGOVIA, 2018; TENREIRO e OUTEIRO, 2015).

Estas são caracterizadas pelo acúmulo de agregados proteicos, como por exemplo os agregados ricos em α -sinucleína na Doença de Parkinson (DP), que interferem em processos celulares normais causando disfunções e/ou morte neural devido ao mal dobramento e agregação das proteínas (PERFEITO e REGO, 2012; SEGOVIA, 2018; TENREIRO e OUTEIRO, 2015).

A DP é uma doença de progressão crônica, considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum segundo dados da EPDA, NPF, PDF (*European*

Parkinson's Disease Association – National Parkinson Foundation – Parkinson Disease Foundation) (SEGOVIA, 2018).

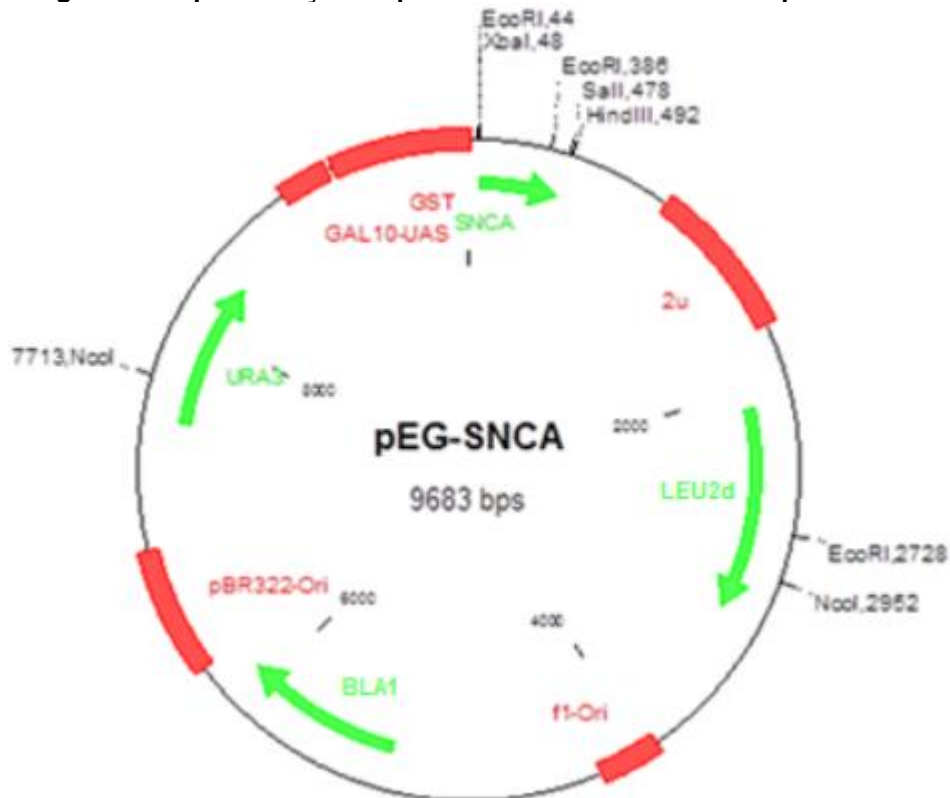
A DP é reconhecida por meio de seu fenótipo motor, alterando o controle na geração dos movimentos voluntários, resultando em problemas locomotores tais como tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural, sendo este resultado da degeneração dos neurónios dopaminérgicos localizados na substância nigra, uma região do mesencéfalo (ANJOS, 2013).

Apesar da etiologia desconhecida, a DP possui como característica a formação de agregados proteicos insolúveis ricos em α -sinucleína (corpos de Lewy), aumento da reatividade glial e de processos neuro-inflamatórios (SEGOVIA, 2018).

Sabe-se também que a agregação da α -sinucleína desencadeia uma série de mecanismos de toxicidade que envolvem aumento do estresse oxidativo por meio do aprisionamento de mitocôndrias pela α -sinucleína levando a falhas no sistema bioenergético da célula além de causar disfunções mitocondriais; aumento da autofagia e do proteassoma; alterações do tráfego vesicular e da endocitose (SEGOVIA, 2018; ZAMPOL, 2013).

Sendo assim, com o intuito de utilizar a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo de organismos e suas interações, Zampol (2013) realizou a construção do vetor recombinante episomal pEG(EK) contendo o gene *SNCA*, o qual codifica a proteína α -sinucleína, sendo este regulado pelo promotor GAL10, e expresso na levedura *S. cerevisiae* em maiores números de cópia na ausência de leucina, o vetor pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática vetor recombinante pEG-SNCA



Fonte: ZAMPOL (2013).

Desta forma, a viabilidade de estudos de interação *in vivo* da proteína α -sinucleína mediante a utilização de sistemas eucarióticos unicelulares faz-se possível. Diante do exposto, propõe-se a realizar um estudo com a linhagem *S. cerevisiae* PD1, obtida no estudo de Zampol (2013) para estudar a interação da proteína α -sinucleína perante a ação do extrato de *Mucuna pruriens*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Extração aquosa das sementes de *Mucuna pruriens*

Visando a obtenção de compostos hidrofílicos por meio de solventes extratores não tóxicos, baratos e de grande disponibilidade, este trabalho realizou a aplicação da extração aquosa de sementes de *M. pruriens*. As sementes foram obtidas comercialmente, *in natura*, e precedidas por moagem, com o auxílio de um moinho de facas, para aumento da superfície de contato do material com o solvente utilizado.

Portanto, para obtenção do extrato, utilizou-se 1 grama de semente de *M. pruriens*, previamente moída para cada 10 mL de água destilada. O extrato foi mantido por 24 horas a 40 °C sob agitação orbital de 200 rpm em shaker (Thoth Equipamentos) e protegido de luz, utilizando-se de papel alumínio ou papel kraft em seu entorno.

Após o período de 24 horas, realizou-se a centrifugação do extrato para a separação de particulados do sobrenadante e posteriormente uma filtração a vácuo utilizando papel filtro qualitativo. Por conseguinte, filtrou-se o extrato em um sistema de filtração Millipore® com membrana de poros com 0,22 µm de diâmetro para eliminação de contaminantes.

Por conseguinte, armazenou-se o filtrado em tubos tipo falcon em temperatura de -60 °C no ultra-freezer (ColdLab®) durante 24 horas para posterior liofilização, mantendo-os protegidos da luz e calor. A liofilização foi realizada a vácuo menor que 500 µHg durante sete dias, em liofilizador Liobras® Liotop L101. Os equipamentos descritos foram utilizados no laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR - Toledo.

6.2 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica do extrato obtido foi realizada por meio de testes qualitativos com indicativos colorimétricos e/ou precipitação. Os grupos de metabólitos secundários estudados foram: saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, flavonóides, taninos e antraquinonas. Os testes citados e detalhados a seguir serão realizados segundo a metodologia descrita por Teixeira *et al.* (2016), Araújo *et al.* (2017) e Filho e Castro (2020) em seus respectivos estudos.

6.2.1 Saponinas - Índice de espuma

Para indicar a presença de saponinas na amostra, o teste foi realizado conforme descrito por Araújo *et al.* (2017). Adicionou-se 2 mL de amostra do extrato em um tubo de ensaio, sendo este submetido a forte agitação e seguido de repouso. A presença de espuma persistente após 15 minutos indica a presença de saponinas na amostra.

6.2.2 Esteróides e Triterpenóides - Reação de Liebermann-Burchard

Para o teste de esteróides e triterpenóides realizou-se a reação de Liebermann-Burchard, conforme descrito por Teixeira *et al.* (2016), sendo esta composta de anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado. Sendo assim no tubo de ensaio contendo 2 mL da amostra de extrato adicionou-se 3 mL de clorofórmio P.A e 2 mL de anidrido acético P.A, seguido de agitação suave, por conseguinte adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado prosseguido de agitação. A presença de coloração azul evanescente indica a presença de esteroides, a presença de coloração verde indica a presença de triterpenóides e a coloração parda avermelhada indica triterpenóides pentacíclicos livres.

6.2.3 Alcalóides - Reagente de *Dragendorff*

A metodologia para teste de presença de alcalóides foi realizada conforme descrito por Teixeira *et al.* (2016). Primeiramente realizou-se a preparação do reagente de *Dragendorff*, sendo este composto pelo preparo de duas soluções, a primeira é obtida pela dissolução de 0,5 gramas de nitrato de bismuto (III) em 10 mL de água destilada, após a formação de uma suspensão, adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) P.A e posterior de agitação para homogeneização.

A segunda solução é preparada em um recipiente separado, desta forma, dissolveu-se 4 gramas de iodeto de potássio em um pequeno volume de água destilada, até a dissolução completa do sal. Após o preparo das duas soluções, realizou-se a mistura de ambas, obtendo-se uma solução de coloração alaranjada escura, utilizada posteriormente no teste para presença de alcalóides.

Sendo assim, em um tubo de ensaio adicionou-se à 2 mL da amostra algumas gotas de hidróxido de sódio à 1 % m/v, seguido de 2 mL de água, e posterior adição

de 2 mL de clorofórmio P.A. A fração aquosa foi desprezada e a fração clorofórmica foi acrescida de algumas gotas de ácido clorídrico a 1 % v/v e em seguida extraída com 2 mL de água.

A fração orgânica (com clorofórmio) foi desprezada e adicionou-se 3 gotas de reagente de *Dragendorff*, previamente preparado, para a verificação da presença de alcalóides. Como indicativo, tem-se que a formação de precipitados insolúveis e floculados revela a presença de alcalóides.

6.2.4 Flavonóides - Teste de cianidina (*shinoda*)

Para a análise de presença de flavonóides realizou-se a reação de *shinoda* utilizando-se HCl concentrado e magnésio. Adicionou-se no tubo de ensaio contendo 2mL de amostra de extrato + 0,5 cm de magnésio em fita e em seguida 2 mL de ácido clorídrico P.A. Após o término da efervescência avaliou-se a coloração resultante da reação. O indicativo de coloração parda, avermelhada, indica a presença de flavonóides no extrato, conforme descrito por Teixeira *et al.* (2016).

6.2.5 Taninos - Reação de precipitação com FeCl_3

Para a análise de taninos adicionou-se 3 gotas da solução alcoólica de FeCl_3 à 10 % m/v em 2 mL de amostra de extrato, por conseguinte agitou-se fortemente a solução e observou-se a mudança de coloração após a reação. A presença de precipitados azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, e para coloração verde de taninos condensados, conforme descrito por Teixeira *et al.* (2016).

6.2.6 Antraquinonas - Reação de Bornträeger

O teste para indicação de presença de antraquinonas foi realizado conforme descrito por Filho e Castro (2020). Sendo assim, utilizou-se 5 mL do extrato aquoso, adicionando-se 5 mL de clorofórmio P.A., agitando vigorosamente e por conseguinte deixado em repouso durante 1 minuto. A fração orgânica foi separada da aquosa, e na fração orgânica adicionou-se 1 mL de solução de NaOH à 5 % (m/v). A presença de coloração roxa indica a presença de antraquinonas na amostra.

6.3 Quantificação de L-dopa por cromatografia líquida de alta eficiência

A quantificação de L-dopa foi desenvolvida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, a metodologia foi realizada no Laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR – Toledo, utilizando o equipamento HPLC - The Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 *Basic Manual system*.

Para a quantificação da molécula de interesse (L-dopa) presente no extrato aquoso de semente de *M. pruriens* utilizou-se um padrão referência grau HPLC para comparação dos picos cromatográficos, concentração e tempo de retenção do controle (padrão) com a amostra de interesse (extrato).

A separação de compostos da matriz complexa (extrato) foi baseada no princípio de polaridade da molécula e no pH de protonação da mesma, sendo este em torno de 3. Sendo assim, utilizou-se água e metanol (80:20) (v/v) como solventes para a fase móvel, adicionando-se ácido acético a 0,5 % (v/v) para controle do potencial hidrogeniônico das soluções.

O sistema de canais para implementação de fase móvel e limpeza/manutenção da coluna utilizados para a cromatografia baseia-se na utilização de:

- A: água:ácido acético (0,5 %);
- B: metanol:ácido acético (0,5 %);
- C: água ultrapura;
- D: Acetonitrila.

As fases móveis foram preparadas em balões volumétricos, sendo seguidas de filtração por membrana Millipore® e ultrassonificação (Cristofoli®) para degaseificação. A coluna utilizada para a cromatografia líquida de alta eficiência foi a C18 (Promosil® C18 5 µm 4,6 x 250 mm – Agela Technologies) com sistema de eluição isocrático. Os comprimentos de onda monitorados pelo equipamento foram: 220; 260; 280 e 295 nm.

6.4 Atividade antioxidante *in vitro*

6.4.1 DPPH

O ensaio para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, 2,2-diphenil-1-picril-hidrazila, foi realizado segundo a metodologia de Embrapa (2007).

Primeiramente preparou-se uma solução mãe de DPPH a 60 μM , utilizando-se álcool metílico.

Por conseguinte, realizou-se diluições da solução mãe, com o auxílio de balões volumétricos, para a execução da curva padrão de DPPH nas concentrações de 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM e 60 μM .

Sendo assim, realizou-se o branco (515 nm) da curva com álcool metílico e prosseguiu-se as medições das absorbâncias, em triplicata, de cada concentração obtida anteriormente à 515 nm, protegendo as soluções da luz utilizando-se papel alumínio. Após as medições, plotou-se o gráfico das concentrações pelas absorbâncias medidas, obtendo-se a equação da reta da curva padrão.

Em seguida preparou-se três concentrações diferentes do extrato liofilizado de *M. pruriens* obtido, de 1 g.L^{-1} , 10 g.L^{-1} e 50 g.L^{-1} . Em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio transferiu-se 0,1 mL de cada concentração do extrato e 3,9 mL da solução mãe de DPPH (60 μM), realizou-se também uma solução controle onde foi adicionado 0,1 mL de álcool metílico ao invés do extrato.

Desta forma, prosseguiu-se o monitoramento das absorbâncias a 515 nm nas diferentes concentrações do extrato, até que houvesse a estabilização da absorbância. Após as leituras plotou-se a curva de absorbância por tempo e avaliou-se a inibição do radical DPPH por meio do cálculo apresentado pela equação Eq. 01:

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) \cdot 100}{Abs_{controle}} \quad \text{Eq.01}$$

6.4.2 ABTS

O ensaio para avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS, radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), foi realizado conforme descrito por Embrapa (2007). Primeiramente preparou-se a solução estoque de ABTS à 7 mM, dissolvendo-se 192 mg de ABTS em 50 mL de água destilada. Por conseguinte, preparou-se uma solução de persulfato de potássio à 140 mM, dissolvendo-se 378,4 mg de persulfato de potássio em 10 mL de água destilada.

Após o preparo das soluções anteriores, realizou-se o preparo da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, sendo esta formada pela reação de oxidação de ABTS e persulfato de potássio. Para isso, utilizou-se 5 mL da solução estoque de ABTS e 88 μL da

solução de persulfato de potássio, manteve-se a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas.

Após o período de 16 horas, realizou-se o ajuste de 1 mL da solução obtida a uma absorvância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm. Por conseguinte, preparou-se uma solução padrão de Trolox à 2 mM, dissolvendo-se 25 mg de trolox em 50 mL de álcool etílico. Por meio da solução padrão de trolox, preparou-se em balões volumétricos, soluções nas concentrações de 100 μM , 500 μM , 1.000 μM , 1.500 μM e 2.000 μM , para posterior realização da curva padrão.

Sendo assim, transferiu-se em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio, 30 μL de cada diluição de trolox e 3,0 mL da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, homogeneizou-se e esperou-se 6 minutos para realizar a leitura da absorvância a 734 nm no espectrofotômetro, utilizando-se álcool metílico como branco.

Após os seis minutos, realizou-se as medições das absorvâncias e plotou-se os dados, obtendo-se a curva padrão de Trolox-ABTS. Por conseguinte, realizou-se o teste utilizando-se 30 μL de extrato e 3,0 mL da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, com os extratos nas concentrações de 1 g.L^{-1} , 0,5 g.L^{-1} e 0,25 g.L^{-1} .

Em seguida, avaliou-se a capacidade antioxidante do extrato por meio das absorvâncias obtidas em cada concentração, expressando em equivalente Trolox por meio da curva padrão anteriormente realizada.

6.4.3 FRAP

O ensaio para avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro, conhecido como FRAP, foi realizado segundo a metodologia descrita por Embrapa (2006).

Primeiramente realizou-se a preparação das soluções requisitadas para o teste, sendo estas: HCl a 40 mM [1,67 mL de HCl em 500 mL de água destilada], TPTZ a 10 mM [312 mg de TPTZ em 100 mL de HCl a 40 mM], Cloreto férrico a 20 mM [0,54 g de cloreto férrico em 100 mL de água destilada], Tampão acetato a 0,3 M [3,1 g de acetato de sódio + 16 mL de ácido acético glacial + água destilada (completar para 1 litro)] e por fim Sulfato ferroso a 2 mM [27,8 mg de sulfato ferroso em 50 mL de água destilada].

A partir da solução padrão de sulfato ferroso 2 mM, preparou-se em balões volumétricos, diluições da solução nas concentrações de 500 μM , 1000 μM e 1500 μM , para construção da curva padrão Sulfato ferroso-FRAP.

Por conseguinte, o reagente FRAP foi preparado por meio da reação de 25 mL de tampão acetato a 0,3 M, com 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM, após este preparo o reagente foi utilizado imediatamente.

Sendo assim, em tubos de ensaio protegidos da luz, adicionou-se 90 μL de cada solução de sulfato ferroso, diluições realizadas anteriormente, acrescentando-se 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizou-se os tubos e manteve-os em banho-maria a 37 °C.

Após 30 minutos no banho maria, realizou-se as medições das absorvâncias a 595 nm, utilizando-se o reagente FRAP como branco. Após as leituras, plotou-se os resultados para obtenção da curva padrão Sulfato ferroso-FRAP.

Por conseguinte, realizou-se o teste utilizando o extrato de *M. pruriens* obtido nas concentrações de 1 g.L^{-1} , 0,5 g.L^{-1} , 0,25 g.L^{-1} e 0,01 g.L^{-1} . O resultado obtido em absorvância foi expresso em μM sulfato ferroso. g^{-1} de extrato.

6.5 Atividade antioxidante *in vivo* - Teste *in vivo* com linhagem *Saccharomyces cerevisiae* ΔGTT1

6.5.1 Preparo do inóculo

O seguinte ensaio utilizou a linhagem mutante *Saccharomyces cerevisiae* ΔGTT1 , cedida gentilmente pelo professor Dr. Mário Henrique de Barros do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

Sendo assim, primeiramente, realizou-se o inóculo da linhagem *S. cerevisiae* ΔGTT1 utilizando 30 mL de meio YPD previamente autoclavado em erlenmeyers de 125 mL, mantendo-o a 30 °C em 150 rpm *overnight*. Após este período, o inóculo preparado foi utilizado nos tratamentos propostos pelo presente estudo, sendo este distribuído em frascos erlenmeyers de 125 mL, utilizando-se volume final de meio de cultivo de 30 mL em uma absorvância ajustada de OD_{600} de 0.6.

6.5.2 Tratamentos com agente estressor (Menadione)

Para a realização dos desafios, utilizou-se o agente estressor Menadione, compondo o grupo experimental: 1 - Controle (apenas meio de cultivo com as linhagens); 2 - Controle com agente estressor (meio com linhagem + Menadione); 3 - Tratamento (meio com linhagem + Menadione + 2,5 g.L⁻¹ de extrato de sementes de *M. pruriens*), como descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Descrição dos ensaios realizados utilizando linhagem de *S. cerevisiae* como modelo in vivo

| Ensaio | Meio de Cultivo YPD + linhagem | Agente estressor – Menadione | | Extrato liofilizado de sementes de <i>Mucuna pruriens</i> |
|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| | Início do ensaio (t = 0 min) | Primeira etapa | Segunda Etapa | Primeira e Segunda Etapa |
| 1 – Controle sem o agente estressor | Presente (OD ₆₀₀ de 0.6) | Ausente | Ausente | Ausente |
| 2 – Controle com agente estressor | Presente (OD ₆₀₀ de 0.6) | Presente (0,25 mM) | Presente (2,5 mM) | Ausente |
| 3 - Tratamento | Presente (OD ₆₀₀ de 0.6) | Presente (0,25 mM) | Presente (2,5 mM) | Presente (2,5 g.L ⁻¹) |

Fonte: Autoria Própria (2021).

O desafio proposto foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa considerada um pré-tratamento, utilizando 0,25 mM de Menadione, agente estressor, sendo seguida pela segunda etapa, com dosagem 10 vezes superior à primeira, utilizando-se uma concentração de 2,5 mM do mesmo.

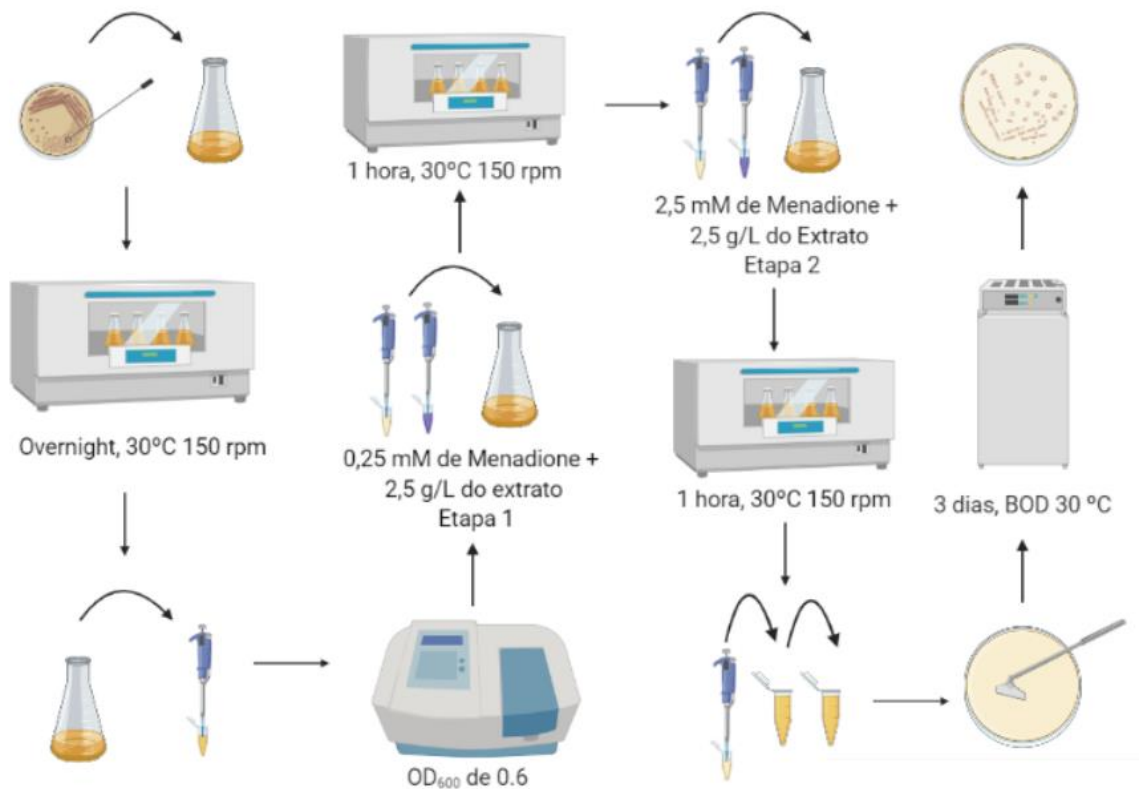
Para os tratamentos propostos utilizou-se, conjuntamente ao agente estressor, o extrato aquoso liofilizado de sementes de *M. pruriens* (substância de interesse) na concentração de 5 g.L⁻¹ do volume final, sendo, portanto, dividida em 2,5 g.L⁻¹ na primeira etapa e 2,5 g.L⁻¹ na segunda. A concentração do extrato foi determinada pelo peso do extrato após a liofilização, sendo este primeiramente ressuspensionado em 200 µL de água estéril para posterior utilização no tratamento.

Após o preparo dos frascos com os devidos reagentes de cada condição experimental, os mesmos foram mantidos em shaker nas condições de 30 °C e agitação orbital de 150 rpm em shaker (Thoth Equipamentos) durante 1 hora cada etapa. Para realizar o monitoramento de densidade ótica pelo tempo do tratamento,

traçou-se uma curva durante 24 horas, sendo, portanto, realizadas medições da absorbância dos tratamentos propostos desde o tempo zero até o tempo final (24 horas).

No final da segunda etapa do tratamento foram plaqueados 100 μ L de cada frasco em placas de meio YPD e realizada a incubação em BOD durante 3 dias para a posterior visualização da viabilidade celular da linhagem por meio do crescimento de unidades formadoras de colônia (UFC) após os tratamentos. A metodologia descrita pode ser visualizada na Figura 7 abaixo.

Figura 7 - Metodologia para realização dos tratamentos com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Autoria própria (2021); Created in BioRender.com.

6.6 Atividade do extrato perante ação da proteína alfa-sinucleína - Teste *in vivo* com linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PD1

6.6.1 Preparo do inóculo

Primeiramente realizou-se um pré-inóculo da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PD1 utilizando 30 mL de meio YNB previamente autoclavado. O mesmo foi

acondicionado a 30 °C em agitação orbital de 150 rpm *overnight*. Após este período, o inóculo foi plaqueado em meio YPGAL e incubado por 3 dias em BOD 30 °C.

Após o crescimento microbiano da linhagem, com a presença de galactose, realizou-se o inóculo em caldo YPD de uma alíquota de células da placa recém preparada, mantendo-a em rotação orbital de 150 rpm a 30 °C. Após este período, o inóculo foi utilizado nos tratamentos respectivos ao estudo, sendo este distribuído em frascos erlenmeyers de 125 mL com volume final de 30 mL em uma absorbância ajustada de OD₆₀₀ de 0.6.

6.6.2 Tratamentos com agente estressor (Menadione)

O seguinte ensaio utilizou a linhagem mutante *Saccharomyces cerevisiae PD1*, cedida gentilmente pelo professor Mário Henrique de Barros do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os tratamentos para a linhagem *Saccharomyces cerevisiae PD1* seguem a mesma metodologia descrita no item 6.5.2.

6.7 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio da utilização do software *Microsoft R Open* versão 3.5, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* a nível de significância de 0,05 garantindo 95 % de confiabilidade dos resultados.

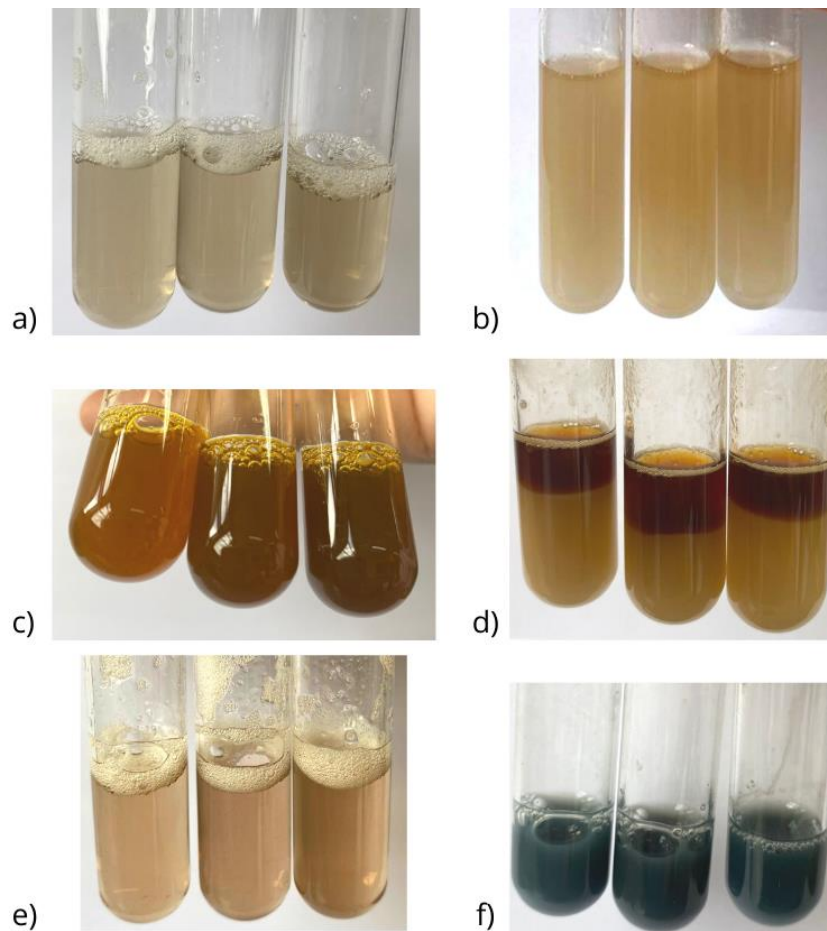
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Triagem Fitoquímica

De acordo com a metodologia proposta obteve-se o extrato aquoso de sementes de *Mucuna pruriens* e realizou-se a triagem fitoquímica utilizando-se a metodologia segundo Teixeira *et al.* (2016), Filho e Castro (2020), descrita na metodologia.

Sendo assim, observou-se a presença e/ou ausência dos metabólitos secundários, qualitativamente, sendo estes: saponinas, esteróides, triterpenóides, triterpenóides pentacíclicos livres, alcalóides, flavonóides, taninos e antraquinonas, por meio de indicativos colorimétricos, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Resultados colorimétricos de metabólitos secundários via triagem fitoquímica: a) Saponinas; b) Esteróides e Triterpenóides; c) Alcalóides; d) Antraquinonas e) Flavonóides e f) Taninos



Fonte: Autoria própria (2021).

Após a visualização colorimétrica, caracterizou-se os resultados como positivo e negativo diante das informações obtidas na literatura de acordo com os indicativos apresentados, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8-Síntese dos resultados obtidos na triagem fitoquímica

| Metabólito secundário | Resultado | Indicativo |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------------|
| Saponinas | Positivo | Espuma persistente |
| Esteróides | Negativo | Coloração azul |
| Triterpenóides | Negativo | Coloração verde |
| Triterpenóides pentacíclicos livres | Positivo | Coloração parda/avermelhada |
| Alcalóides | Negativo | Presença de precipitados |
| Flavonoides | Positivo | Coloração avermelhada |
| Taninos hidrolisáveis | Positivo | Coloração azul |
| Taninos condensados | Negativo | Coloração verde |
| Antraquinonas | Negativo | Coloração roxa |

Fonte: A autoria própria (2021).

Sendo assim, o extrato de sementes de *M. pruriens* apresenta em sua composição a presença de metabólitos secundários das classes: saponinas, triterpenóides pentacíclicos livres, flavonóides e taninos hidrolisáveis.

Dentre as classes detectadas na triagem fitoquímica abordada acima ressalta-se a estrutura molecular em comum entre os flavonóides e os taninos hidrolisáveis, sendo que estes compostos fenólicos apresentam propriedades reconhecidas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antitumoral (CUNHA *et al.*, 2016).

Quanto às particularidades dos flavonóides destaca-se a formação de pigmentos naturais, sendo estes evidenciados no extrato de *M. pruriens*, que por sua vez apresenta coloração amarronzada (caramelo). Tais pigmentos reforçaram a presença de L-dopa, que é precursora de suas vias biossintéticas, via da betacianina (SOARES, 2019) e melanina (BERTOLAZI, 2016) respectivamente.

Os taninos por sua vez caracterizam-se por sua estrutura, a qual é formada por unidades ou resíduos de ácido gálico, substância rara na dieta humana, sendo, portanto, um composto de interesse da indústria alimentícia (CASTEJON, 2011).

Em alguns estudos os taninos ainda apresentaram propriedades como: adstringência, relaxador e reparador de tecidos, regulação enzimática e proteica, vasodilatadora e antimicrobiana. Sendo foco de estudo para atividade antitumoral, anti-infecciosa e formação de complexos tanino-proteínas que possibilite reparação tecidual naturalmente (SAAD *et al.*, 2018; CASTEJON, 2011).

Uma das características fortemente expressas pelo extrato de *M. pruriens* durante o estudo foi a formação de espuma persistente ao manusear e/ou agitar o mesmo, caracterizando o metabólito secundário da classe das saponinas, o qual possui estrutura de caráter anfifílico, ou seja, possuinte de uma parte hidrofílica e uma parte lipofílica, caracterizando este grupo com propriedades detergentes e emulsificantes (CASTEJON, 2011).

As saponinas fazem parte do sistema de defesa das plantas devido sua alta capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídios de membranas, possibilitando diversas ações biológicas (CASTEJON, 2011). Dentre estas ações destaca-se a atividade antioxidante, hemolítica, ictiotóxica (plantas aquáticas), moluscicida, antitussígena e hipocolesterolemiantes, sendo uma substância de interesse no âmbito médico como potencial expectorante, hipocolesterolemiantes (reduzidor de colesterol), atividade diurética e adjuvantes (SAAD *et al.*, 2018; CASTEJON, 2011).

Já os triterpenóides pentacíclicos livres são compostos importantes para a estabilização de bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares das plantas. Estudos revelam que esta classe de compostos possui atividade antiproliferativa, pró apoptótica, anti-inflamatória, analgésica, cicatrizante, antitumoral, reparação tecidual e antipirética (SILVA *et al.*, 2014).

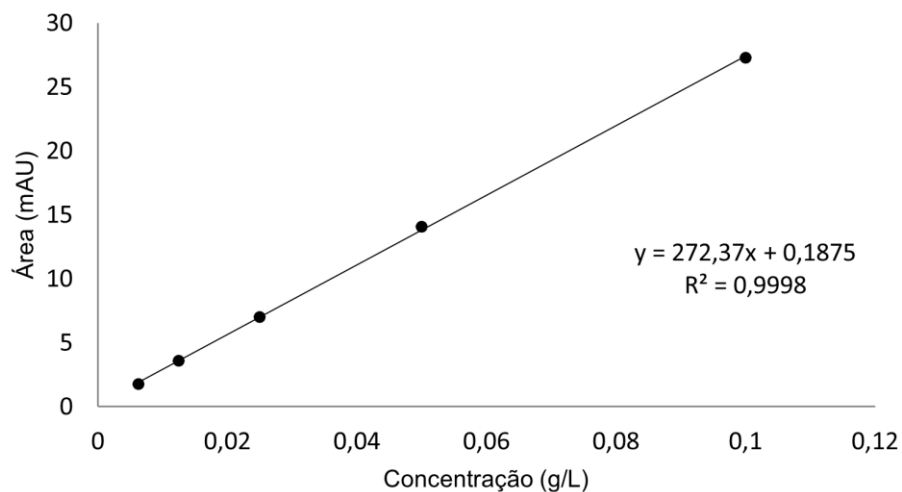
Nota-se que assim como as saponinas, os triterpenóides possuem alta afinidade com a membrana celular, ressaltando que seus mecanismos de ação dá-se pela sua solubilidade, afinidade e permeabilidade de membranas e tecidos, desta forma o controle e doseamento da substância deve ser acompanhada clinicamente para não desencadear respostas imunológicas indesejáveis, ocasionando intoxicação do organismo, apesar das diversas propriedades benéficas reconhecidas.

Desta forma, diante do exposto pode-se inferir por meio da triagem fitoquímica do extrato de sementes de *M. pruriens* que sua composição possui uma gama de compostos com propriedades com atividade biológica, tendo como principais citadas: antioxidante, antimicrobiano, reparação de tecidos, interação com membrana e formação de complexos.

7.2 Quantificação de L-dopa presente em extratos de *Mucuna pruriens*

Com o intuito de caracterizar e quantificar a molécula de interesse L-dopa, realizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), como descrito anteriormente. Sendo assim, realizou-se a curva padrão da concentração de L-dopa, como pode ser visualizado na Figura 9, com a utilização de um padrão grau HPLC como referência para quantificar a concentração presente no extrato de *M. pruriens*.

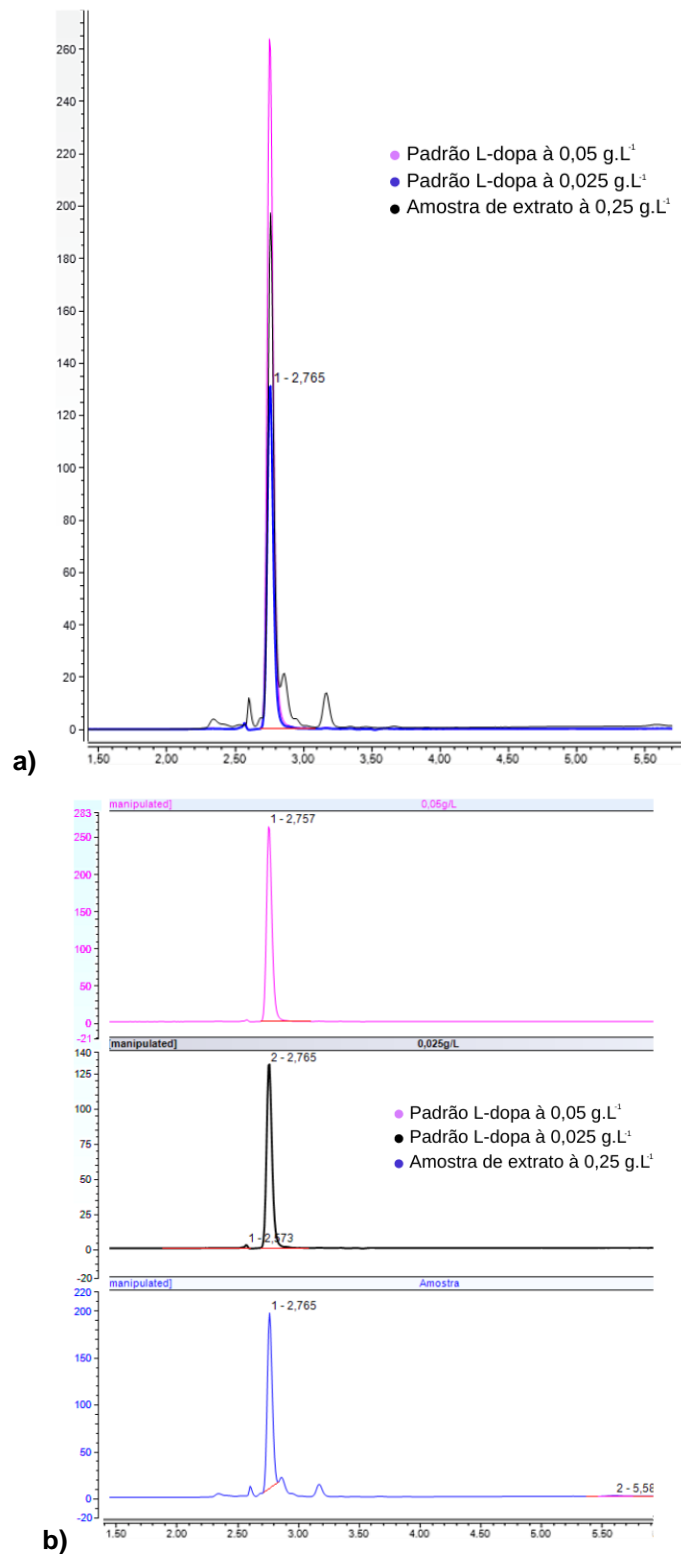
Figura 9 - Curva padrão de L-dopa por cromatografia líquida de alta eficiência à 280 nm



Fonte: Autoria própria (2021).

Após a realização da curva padrão, determinou-se a concentração do extrato de semente de *M. pruriens* liofilizado obtido, eluindo a amostra nas mesmas condições do padrão utilizado, resultando no cromatograma (280 nm) apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma Extrato de sementes de *M. pruriens* + Padrão L-dopa a) Cromatogramas sobrepostos b) Cromatogramas do Padrão a 0,05 g.L⁻¹; Amostra de extrato de *Mucuna pruriens* à 0,25 g.L⁻¹, e Cromatograma Padrão 0,025 g.L⁻¹ respectivamente



Fonte: Autoria própria (2021).

Por meio do cromatograma acima observa-se que o pico referente ao padrão L-dopa teve tempo de retenção equivalente a 2,77 minutos, nota-se também que o

extrato de *M. pruriens* apresentou um pico no mesmo tempo, sendo este equivalente ao padrão.

Nos estudos citados anteriormente (item 5.4) tem-se que o composto L-dopa possui tempos de retenção diferentes de acordo com o solvente extrator e da fase móvel utilizada. Tal propriedade é citada na literatura devido a afinidade do composto e suas propriedades, reconhecendo a necessidade da utilização de um padrão puro para a caracterização e quantificação de compostos.

Sendo assim, por meio da área obtida do pico eluído pelo extrato determinou-se por meio da curva padrão que a amostra do extrato liofilizado na concentração de $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ equivale a $0,039 \text{ g.L}^{-1}$ de L-dopa, ou seja, $156,19 \text{ mg.g}^{-1}$ [mg de L-dopa por grama de extrato liofilizado], ou seja, 15,6 % da amostra.

Nos estudos de Longhi (2007) a quantificação de L-dopa em solvente etanólico revelou uma baixa concentração de L-dopa no extrato, equivalente a $13,51 \text{ mg.g}^{-1}$ [mg de L-dopa por grama de extrato liofilizado], uma vez que a substância não possui boa solubilidade em etanol, assim como evidenciado no presente estudo. Quando realizada em meio aquoso acidificado a concentração determinada foi alta, apresentando 120 mg.g^{-1} [mg de L-dopa por grama de extrato liofilizado].

Como dito anteriormente, a concentração do extrato aquoso obtido no presente estudo foi de $156,19 \text{ mg.g}^{-1}$ [mg de L-dopa por grama de extrato liofilizado], sendo esta portanto maior do que a obtida pelo extrato aquoso acidificado nos estudos de Longhi (2007), no qual obteve 120 mg.g^{-1} .

Perez (2009) realizou extrações exaustivas e quantificou a concentração de L-dopa total em 4,20 %, relatando em seu trabalho que se percebeu perdas no teor em função do processo exaustivo, muito provavelmente devido a oxidação do composto devido a espera de conclusão das três exaustões.

Assim como Perez (2009), o presente estudo evidencia que a oxidação do extrato de *M. pruriens* deve ser um alarde para futuros trabalhos, necessitando de armazenamento adequado, protegido da luz solar e preferencialmente refrigerado.

Diante dos dados conclui-se que a extração em meio aquoso favorece a extração de L-dopa das sementes de Mucuna, devido a sua característica altamente hidrofílica. Quanto a eluição do composto revela-se que o potencial hidrogeniônico ácido auxilia a separação, uma vez que o pKa da L-dopa é de 2,32.

Sendo assim, constata-se que a extração realizada foi eficiente para a obtenção de uma alta concentração de L-dopa, utilizando-se um solvente universal, atóxico e

de baixo custo, apresentando-se como uma ótima alternativa para obtenção da substância de interesse para fins farmacológicos.

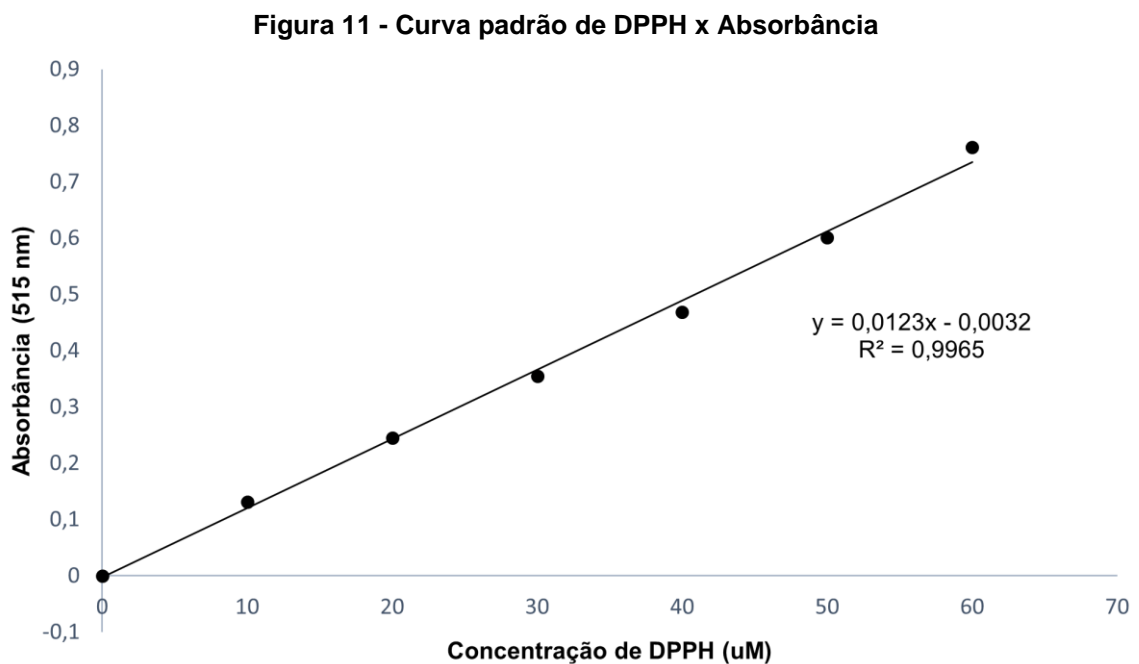
7.3 Atividade antioxidante do extrato de *Mucuna pruriens*

Para avaliar as propriedades antioxidantes do extrato de *M. pruriens* realizou-se testes *in vitro*, por meio dos testes DPPH, ABTS e FRAP, e *in vivo* por meio do estresse oxidativo induzido em leveduras mutantes, como citado anteriormente.

7.3.1 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

7.3.1.1 DPPH

Desta forma, a fim de quantificar a equivalência do extrato em μM de DPPH realizou-se primeiramente uma curva padrão de DPPH ilustrada na Figura 11 abaixo.

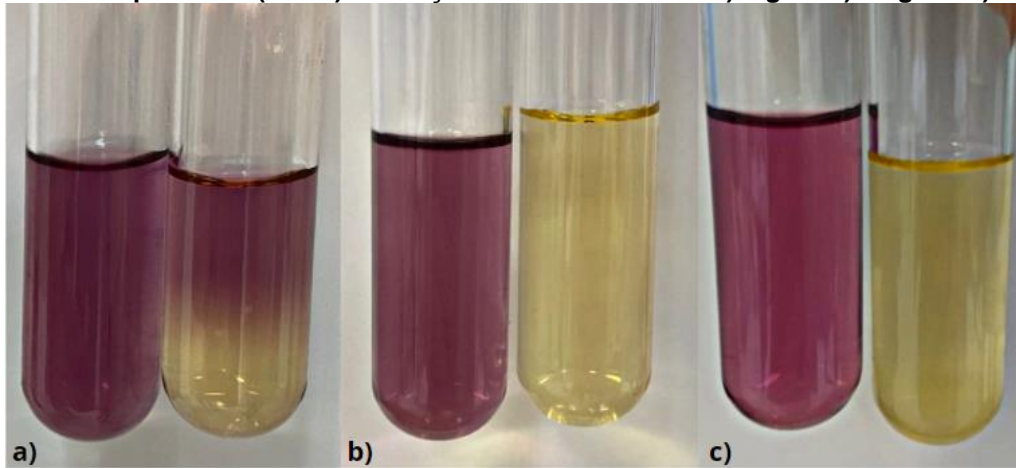


Fonte: Autoria própria (2021).

A solução de DPPH possui coloração violeta escura e após sua reação com o antioxidante a mesma torna-se violeta claro ou amarelada, possibilitando a visualização da mudança de coloração e decréscimo da absorbância.

Sendo assim, realizou-se o teste com três concentrações do extrato de *M. pruriens*, 1 g.L^{-1} , 10 g.L^{-1} e 50 g.L^{-1} , no entanto ao adicionar o extrato nas duas concentrações mais altas (10 g.L^{-1} e 50 g.L^{-1}) a mudança de coloração de violeta escura para amarela ocorreu de forma instantânea (Figura 12), impossibilitando o acompanhamento cinético da substância, uma vez que a absorbância atingia a zero em menos de um minuto.

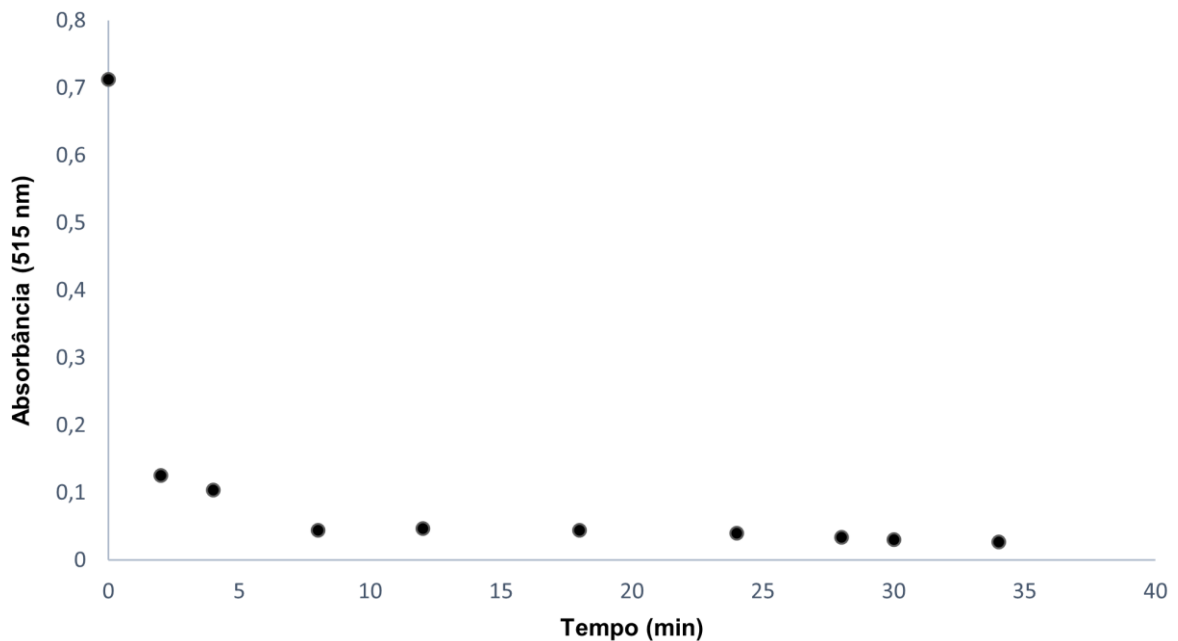
Figura 12 - Tempo inicial (1 min) da reação DPPH-Extrato em a) 1 g.L^{-1} b) 10 g.L^{-1} c) 50 g.L^{-1}



Fonte: Autoria própria (2021).

Desta forma prosseguiu-se o estudo cinético proposto pela metodologia com a concentração de 1 g.L^{-1} , medindo a absorbância até atingir uma estabilização da mesma, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Curva cinética do método DPPH utilizando extrato de sementes de *Mucuna pruriens*



Fonte: Autoria própria (2021).

Diante da curva cinética nota-se que nos primeiros 2 minutos há um decaimento de 82,37 % na absorbância, indicando um alto potencial antioxidante do extrato de *M. pruriens* à 1 g.L⁻¹.

Após 30 minutos de reação houve a estabilização da absorbância do composto, podendo detectar uma inibição de 95,699 % do radical DPPH, ou seja, a inibição de 55,3 µM de DPPH.

No estudo de Jimoh *et al.* (2020) citado anteriormente os extratos de *M. pruriens* até mesmo em baixas concentrações (0,0025 g.L⁻¹ e 0,005 g.L⁻¹) demonstraram inibição do radical em 58 % em frente ao controle (Rutina) com inibição de 37 % nas mesmas concentrações.

Nos estudos de Tiveron (2010) os padrões utilizados como controle foram BHT e α -tocoferol (Vitamina E), à 200 ppm, resultando em uma inibição do radical DPPH de 19,8 % e 96,3 %, respectivamente. Em comparativo com o presente estudo tem-se que o extrato de sementes de *M. pruriens* liofilizado à 1 g.L⁻¹ demonstra maior capacidade antioxidante quando comparada ao BHT e capacidade similar ao α -tocoferol.

Desta forma, infere-se que a utilização do extrato obtido possui capacidade antioxidante requerida para a utilização como conservantes de âmbito alimentar e

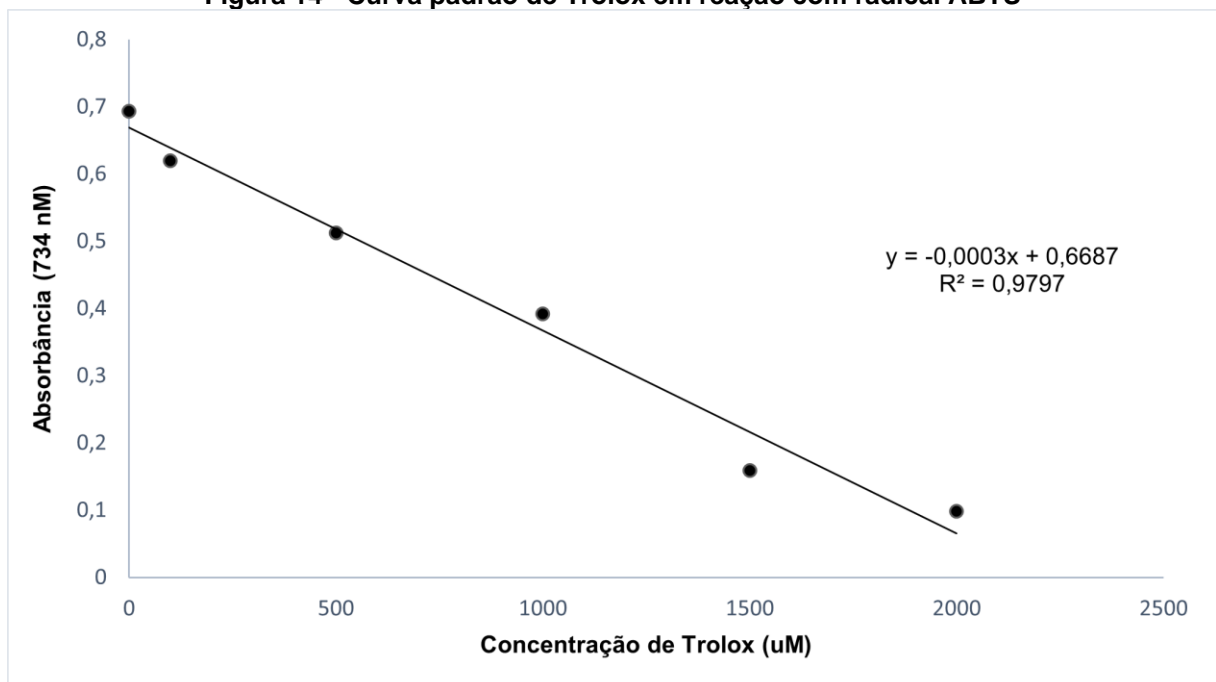
cosmético, consoante a adaptação de formulações, sendo, portanto, uma alternativa para tais setores.

7.3.1.2 ABTS

O ABTS é baseado na captação do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) possuindo coloração verde escura, e quando em contato com compostos antioxidantes sua coloração passa para verde claro ou até mesmo para o desaparecimento total da coloração.

O método ABTS descrito mensura o efeito de substâncias potencialmente antioxidantes por sua equivalência em atividade antioxidante Trolox, um composto sintético análogo à vitamina E, reconhecido e utilizado na indústria alimentícia como um potente antioxidante. Sendo assim, primeiramente realizou-se a curva padrão de Trolox-ABTS como pode ser visualizada na Figura 14 abaixo.

Figura 14 - Curva padrão de Trolox em reação com radical ABTS



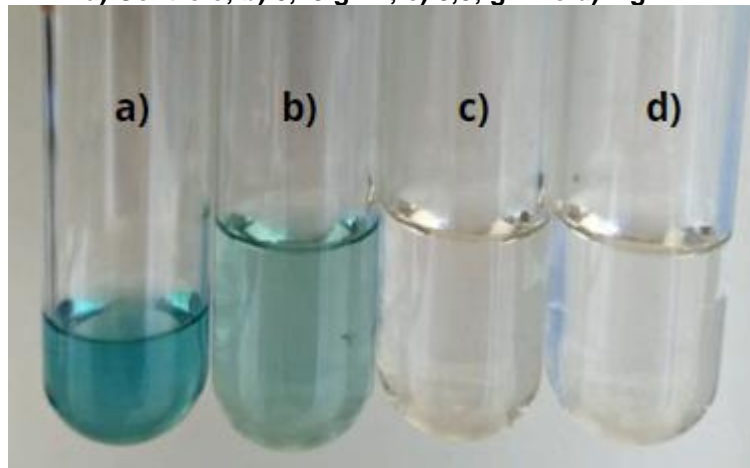
Fonte: Autoria própria (2021).

Sendo assim, realizou-se o teste com três concentrações do extrato de *M. pruriens*, 1 g.L^{-1} , $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, após os 6 minutos de reação propostos na metodologia realizou-se a medição da absorbância final à 734 nm. Observando-se a

coloração final da reação (Figura 15) nota-se que nas concentrações de 0,5 g.L⁻¹ e 1 g.L⁻¹ houve o desaparecimento total da coloração quando comparado com o controle.

Este resultado indica completa captação do radical ABTS pelo extrato de *M. pruriens* nestas concentrações, apresentando concentração maior ou equivalente a maior concentração de Trolox utilizada na curva padrão.

Figura 15 - Coloração após 6 minutos de reação ABTS + amostra
a) Controle; b) 0,25 g.L⁻¹; c) 0,5; g.L⁻¹ e d) 1 g.L⁻¹



Fonte: Autoria própria (2021).

O extrato em 0,25 g.L⁻¹ teve um decaimento de absorvância igual a 64,18 %, atingindo absorvância de 0,248, ou seja, 1401 µM de Equivalente Trolox, estimando-se, portanto, uma concentração de 5604,89 µM de Trolox.g⁻¹ de extrato de *M. pruriens* liofilizado.

No estudo de Jimoh *et al.* (2020) citado anteriormente o extrato de *M. pruriens* na concentração de 0,02 g.L⁻¹ demonstrou inibição do radical em 68 % em frente ao controle (Rutina) com inibição de 30 % na mesma concentração, apresentando ainda menores concentrações com atividade antioxidante alta.

Nos estudos de Longhi (2007) demonstrou-se que 12,71 µg do extrato acidificado liofilizado de *M. pruriens* equivale a 45,43 µg de Trolox. No presente estudo, revelou-se que 0,25 g do extrato aquoso liofilizado de *M. pruriens* equivale a 0,35 g de Trolox, ou seja um resultado 2,5 vezes menor do que quando comparada a extração acidificada de Longhi (2007).

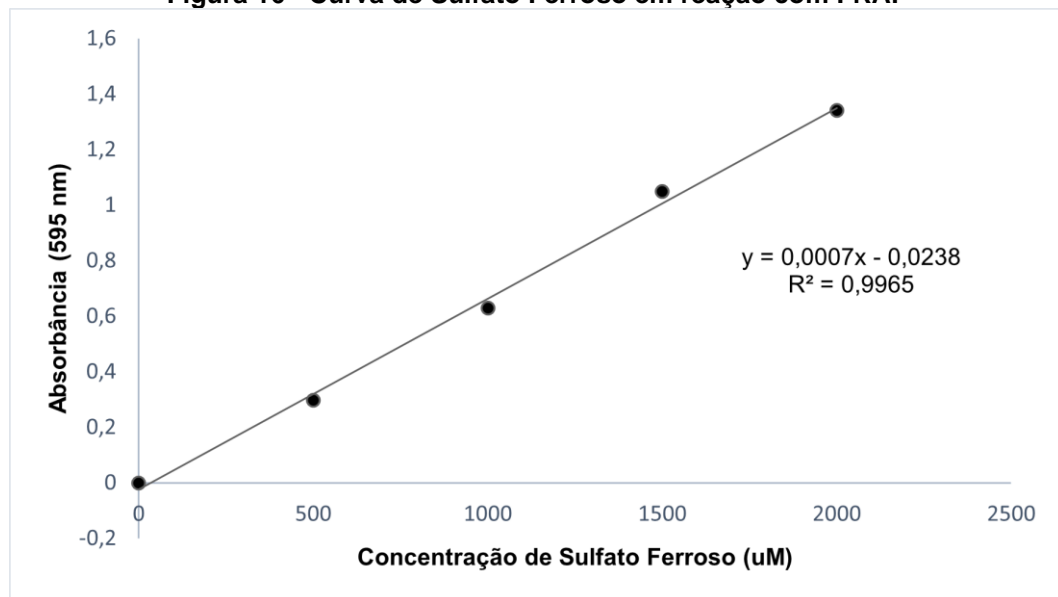
Sendo assim, evidencia-se que o tipo do solvente extrator e suas propriedades influenciam na obtenção não somente de metabólitos secundários, como visto anteriormente, mas como na obtenção de maior ou menor atividade antioxidante, devido a condições de pH e estrutura molecular dos compostos extraídos.

Diante dos dados obtidos nota-se também que apesar do estudo de Jimoh *et. al* (2010) utilizar uma concentração 10 vezes inferior à utilizada neste trabalho, a porcentagem de inibição do radical ABTS manteve-se próxima à mensurada com o presente estudo, mostrando-se como um estudo linear e reprodutível.

7.3.1.3 FRAP

O método FRAP baseia-se na mensuração direta da capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ à $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, sendo este expresso pela concentração de Sulfato Ferroso. Este complexo formado possui coloração azul clara e após a reação com antioxidantes o complexo reduzido expressa a coloração azul escura, sendo assim realizou-se a curva padrão de Sulfato Ferroso-FRAP, visualizada na Figura 16.

Figura 16 - Curva de Sulfato Ferroso em reação com FRAP



Fonte: Autoria própria (2021).

Por conseguinte, realizou-se o teste com quatro concentrações do extrato de *M. pruriens*, 1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 0,25 g.L⁻¹ e 0,01 g.L⁻¹, após a reação realizou-se a medição da absorbância final à 595 nm. As concentrações de 1 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ não se enquadraram nos valores detectáveis pela curva realizada.

Sendo assim, utilizou-se os valores de absorbâncias de 0,25 g.L⁻¹ e 0,01 g.L⁻¹ para expressar em equivalente de Sulfato Ferroso, sendo este calculado em 8586,64

μM Sulfato Ferroso. g^{-1} de extrato de *M. pruriens* liofilizado, ou equivalente a 2,38 g Sulfato Ferroso. g^{-1} de extrato.

O presente estudo quantificou uma concentração equivalente a de 695,137 mg Fe (II). g^{-1} de extrato. Quando comparado ao estudo de Brito (2014), observa-se que o extrato obtido possui uma concentração de Fe (II) 4,66 vezes superior ao controle Rutina avaliado por Brito (2014).

Jimoh (2007) em seu estudo avaliou que a concentração de Fe (II) obtido ao final dos ensaios foi 1,13 vezes inferior nas análises do extrato quando comparado ao controle Rutina, apresentando-se novamente a frente do controle testado.

Segundo Jimoh (2007) a constatação de uma elevada concentração de Fe (II) em estudos utilizando sementes de *M. pruriens* dá-se ao fato de as sementes serem ricas em minerais, tais como ferro e cobre.

Desta forma, tem-se que apesar de um elevado resultado perante a concentração de Fe (II), estima-se que uma parte desta concentração, dá-se ao fato da rica composição das sementes e não apenas pela transferência de elétrons determinada pelo teste FRAP.

7.3.2 Avaliação da capacidade antioxidante *in vivo*

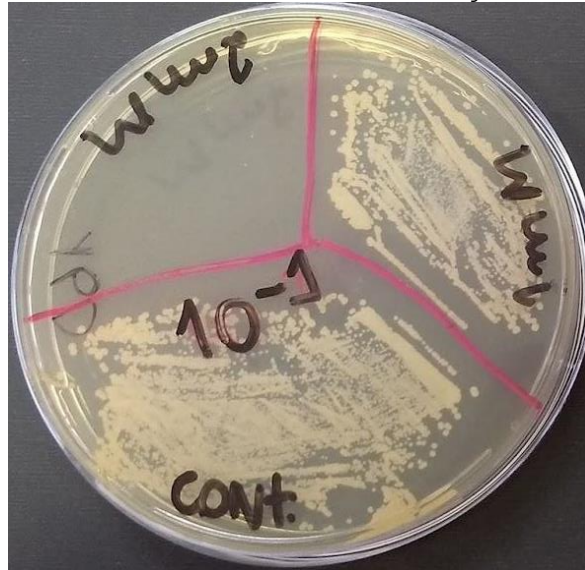
Para a avaliação da capacidade antioxidante do extrato de sementes de *Mucuna pruriens in vivo* utilizou-se a linhagem mutante de *S. cerevisiae* ΔGTT1 como modelo de estudo.

Como dito anteriormente, o gene GTT1 é responsável pela produção da proteína *Glutathione S-transferase (GST)*, caracterizada por sua ação detoxificante, capaz de combater radicais livres xenobióticos e intracelulares, desta forma, com a deleção do gene GTT1, a linhagem fica mais suscetível ao ataque de radicais livres, ocasionando desequilíbrio metabólico e por consequência a apoptose celular.

Sendo assim, a fim de intensificar o estresse osmótico no meio, utilizou-se o agente estressor Menadione (vitamina K3), um composto orgânico com propriedades citotóxicas, gerador de EROs e conhecido pela indução de apoptose. Alguns estudos como os de I LAUX e A NEL (2001) constatam que esta substância afeta diretamente funções mitocondriais de células, sendo, portanto, um potente indutor de estresse oxidativo em altas dosagens.

Portanto, primeiramente realizou-se um teste para avaliar a dosagem necessária de Menadione, induzindo o estresse oxidativo a fim de ocasionar apoptose generalizada na linhagem. Foram realizados dois ensaios, o primeiro com 1 mM (segunda etapa) e o segundo em 2 mM (segunda etapa), os resultados após a segunda etapa podem ser visualizados na Figura 17.

Figura 17- Desafios com diferentes concentrações de Menadione

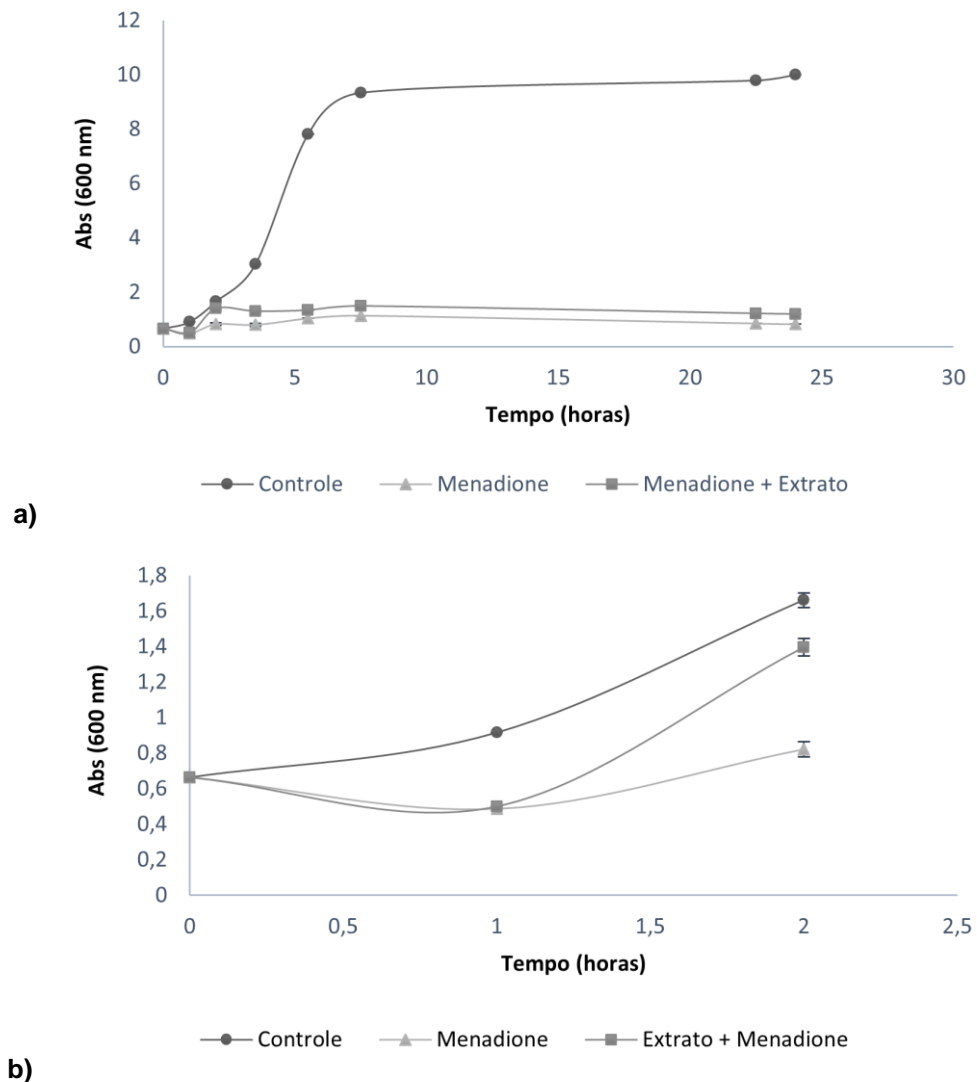


Fonte: Autoria própria (2020).

Como pode ser observado, na Figura 17, utilizando-se 2 mM de Menadione o crescimento da linhagem é ausente, apresentando diferença significativa a 95 % de confiabilidade, evidenciando a eficiência do agente estressor perante aos danos celulares descritos na literatura. Para fins de exacerbação do estresse osmótico no meio para a realização da avaliação da capacidade antioxidante do extrato, realizou-se os tratamentos utilizando 0,25 mM de Menadione na primeira etapa e 2,5 mM na segunda etapa.

Os tratamentos/desafios foram realizados de acordo com a Figura 7, citada na metodologia (item 6.5.2) deste trabalho. Sendo assim, o monitoramento das absorbâncias, por 24 horas (a) e durante o tratamento (b), que indica a taxa de sobrevivência da linhagem nas condições propostas, pode ser visualizado na Figura 18 abaixo.

Figura 18 - Curva da taxa de sobrevivência da linhagem *S. cerevisiae* Δ GTT1 a) Durante período de 24 horas b) Recorte dos tempos iniciais do tratamento



Fonte: Autoria própria (2021).

Nota-se que o controle, onde havia apenas as células de *S. cerevisiae* Δ GTT1, sem o agente estressor, apresentou um crescimento expressivo demonstrando que as células da linhagem utilizada nos ensaios apresentavam-se viáveis desde o tempo zero (início do ensaio) até o período de 24 horas.

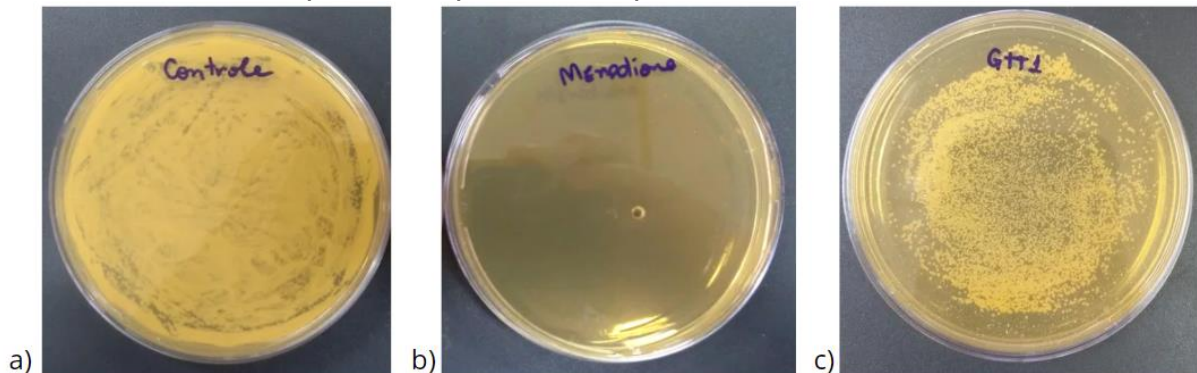
O ensaio contendo as células de *S. cerevisiae* Δ GTT1, com o agente estressor, sem nenhuma substância potencialmente antioxidante, observa-se que a absorbância possui um decaimento após a primeira hora do ensaio e um leve aumento no período de duas horas, demonstrando que o agente estressor possui interferência expressiva e significativa, a 95 % de confiabilidade, no crescimento celular quando comparado com o ensaio controle.

Já o ensaio contendo as células de *S. cerevisiae* $\Delta GTT1$ + agente estressor + extrato de sementes de *M. pruriens* (substância potencialmente antioxidante), nota-se que a absorbância possui um decaimento após a primeira hora do ensaio, podendo este ser definido como um período de adaptação da linhagem perante a mudança da composição do meio, uma vez que se realizou a adição de duas novas substâncias, o extrato e o agente estressor.

Após este período, observa-se o aumento da absorbância no tempo de duas horas de ensaio, evidenciando a multiplicação celular e por consequência a ação do extrato de *M. pruriens* frente a ação do agente estressor Menadione, apresentando diferença significativa a 95 % de confiabilidade frente ao ensaio contendo apenas o agente estressor.

O estudo por meio da absorbância evidencia que a multiplicação e a densidade ótica (OD) celular é aumentada com a utilização do extrato de sementes de *M. pruriens*, no entanto para inferir se esta substância influencia na viabilidade celular realizou-se o plaqueamento de uma alíquota no tempo de duas horas do tratamento a fim de verificar tal efeito, o resultado pode ser visualizado na Figura 19.

Figura 19 - Viabilidade celular da *S. cerevisiae* $\Delta GTT1$ após duas horas de tratamento
a) Controle b) Menadione c) Extrato + Menadione



Fonte: Autoria própria (2021).

Diante do teste de viabilidade celular realizado e ilustrado na Figura 19 observa-se que além do aumento da densidade ótica evidenciado por meio da absorbância, a viabilidade celular também é aumentada quando há a inserção do extrato de sementes de *M. pruriens* no meio, tendo ação antioxidante perante a ação do agente estressor e da deleção do gene *GTT1*.

Desta forma confirma-se por meio dos testes, tanto *in vitro* como *in vivo*, que o extrato obtido possui ação antioxidante, além de comprovar, diante pareceres obtidos, que testes utilizando modelos *in vivo* por meio de linhagens mutantes de *S. cerevisiae* possuem assertividade quanto aos resultados alcançados.

Sendo assim, infere-se que o extrato de sementes de *M. pruriens* pode ser utilizado na prevenção e remediação de disfunções relacionadas ao aumento da concentração de radicais livres no organismo humano devido sua ação antioxidante.

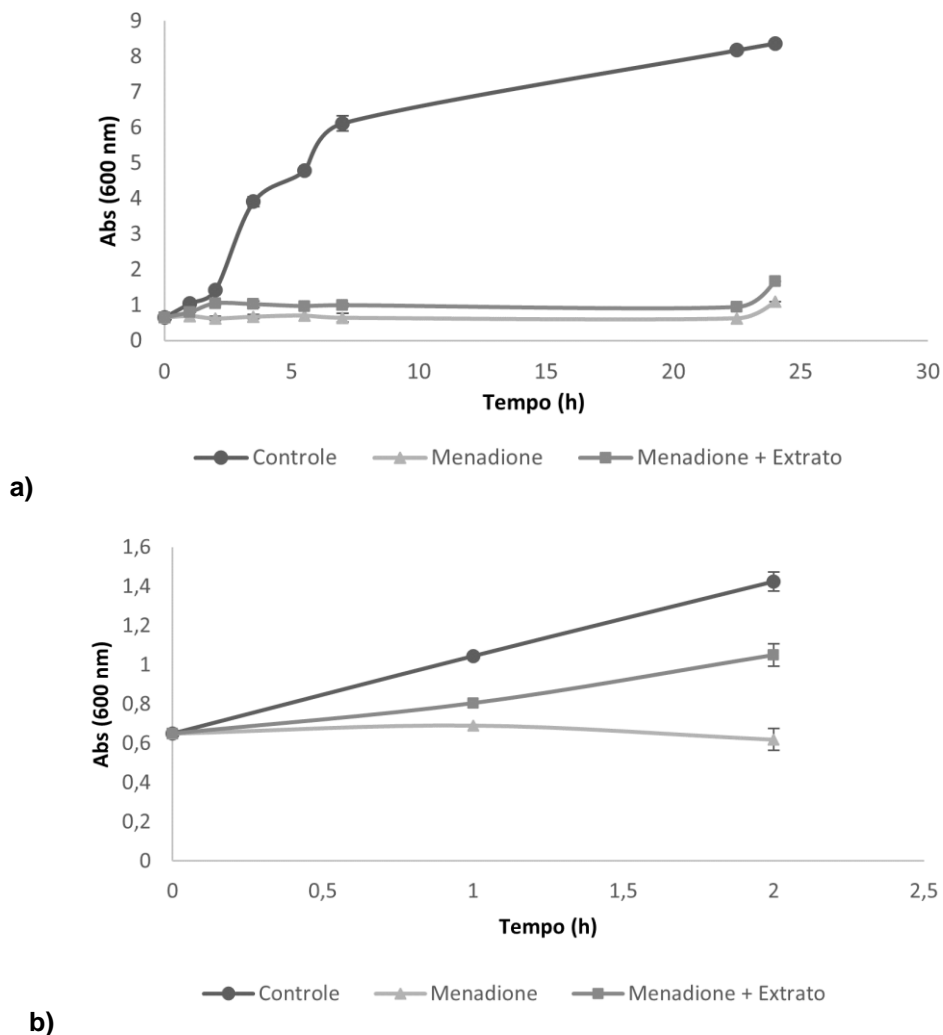
7.4 Doença de *Parkinson* e a proteína *alfa-sinucleína*

Com o intuito de utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo *in vivo* para avaliar a ação do extrato de sementes de *Mucuna pruriens* perante a expressão/atividade da proteína alfa-sinucleína, o presente trabalho utilizou a linhagem mutante *S. cerevisiae PD1*, obtida no estudo de Zampol (2013), em condições de estresse induzido, como descrito anteriormente.

Os radicais livres favorecem a ação da proteína alfa-sinucleína, aumentando sua toxicidade e conseqüentemente a morte celular, sendo assim, diante da metodologia anteriormente descrita realizou-se os desafios com a linhagem *S. cerevisiae PD1* com estresse induzido pelo agente estressor Menadione, utilizando-se 0,25 mM (primeira etapa) e 2,5 mM (segunda etapa).

Por conseguinte, avaliou-se a taxa de sobrevivência da linhagem, após o tratamento e durante 24 horas, e em seguida plotou-se as absorbâncias obtidas durante o monitoramento, como pode ser observado na Figura 20 abaixo.

Figura 20 - Curva da taxa de sobrevivência da linhagem *S. cerevisiae* PD1 a) Durante período de 24 horas b) Recorte dos tempos iniciais do tratamento



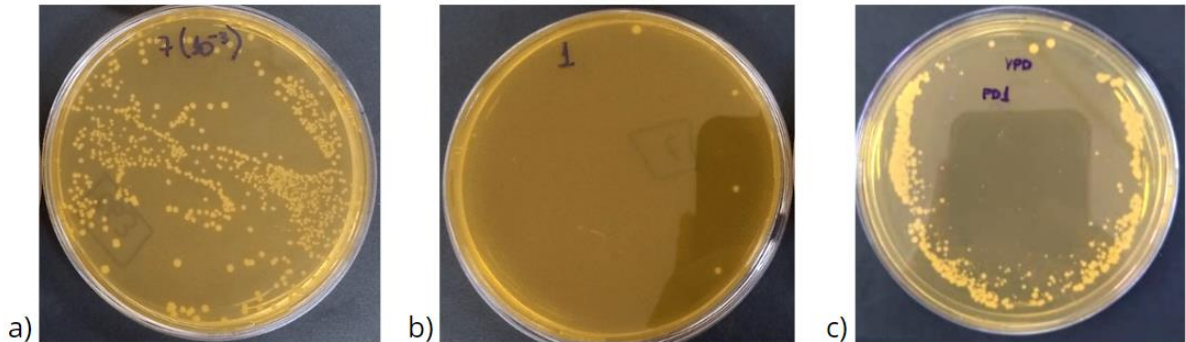
Fonte: Autoria própria (2021).

Como pode-se observar as curvas de controle e menadione possuem comportamento similar às curvas identificadas com a linhagem *S. cerevisiae* $\Delta GTT1$. Nota-se também que o extrato obteve um aumento significativo perante ao agente estressor, o qual decaiu após o tempo de duas horas de tratamento.

Tal comportamento evidencia que quanto maior a concentração de radicais livres no meio maior será a toxicidade expressa pela proteína alfa-sinucleína, catalisando o decaimento celular e inviabilização das células.

Assim como anteriormente demonstrado, realizou-se o plaqueamento para a análise de viabilidade celular após o período de tratamento, podendo este ser visualizado na Figura 21 abaixo.

Figura 21- Viabilidade celular da *S. cerevisiae* PD1 após duas horas de tratamento
a) Controle (diluído a 10^{-3}) b) Menadione c) Extrato + Menadione



Fonte: Aatoria própria (2021).

Como pode ser observado a ação do extrato de sementes de *M. pruriens* foi eficaz no aumento da taxa de sobrevivência da linhagem perante a ação do agente estressor e toxicidade da proteína alfa-sinucleína, quando comparado com o ensaio com apenas o agente estressor, sendo estes diferentes significativamente à 95 % de confiabilidade.

Desta forma evidencia-se que o extrato obtido possui ação farmacológica correlacionada com a toxicidade de agregados proteicos de alfa-sinucleína e de radicais livres em altas concentrações, que ocasionam diversas disfunções nos organismos, sendo estas potencializadas com o envelhecimento e fatores externos, podendo este ser utilizado como coadjuvante no tratamento da doença de *Parkinson*.

8. CONCLUSÃO

Diante do exposto evidencia-se que o extrato de sementes de *M. pruriens* possui propriedades antioxidantes, uma vez que os testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram resultados positivos e superiores aos controles relatados na literatura. Nota-se que a extração em meio aquoso foi eficaz para a extração de L-dopa, devido sua alta afinidade, refletindo em sua alta concentração, 156,19 g.L⁻¹ [g de L-dopa por litro de extrato liofilizado de semente de *M. pruriens*].

Dentre os metabólitos secundários identificados na composição do extrato, evidenciou-se que as propriedades mais mencionadas na literatura diante aos grupos identificados foram: antioxidante, antimicrobiano, reparação de tecidos, interação com membrana e formação de complexos. Essas propriedades explicitam a gama de opções terapêuticas que o extrato pode ser aplicado, assim como a abertura de novos estudos.

O ensaio *in vivo* frente a proteína alfa-sinucleína revela que o extrato possui relevância quanto a reversão de danos oriundos da toxicidade da proteína, evidenciando a possibilidade de seu uso para fins terapêuticos em pacientes portadores de doença de Parkinson.

Verificou-se também quanto à composição das sementes de *M. pruriens*, a qual pode ser utilizada na alimentação para o aumento de minerais e outros nutrientes. Evidencia-se também a importância do reconhecimento de outras substâncias potenciais de sua composição, assim como a avaliação toxicológica, a fim de garantir a segurança na dosagem de ingestão diária.

Propõe-se também, para trabalhos futuros, realizar a padronização de uma metodologia rápida, como por exemplo a de DPPH, para a quantificação de L-dopa de forma indireta, a fim de tornar o teste de quantificação mais viável e barato com um teste rápido e menos custoso.

Evidencia-se também a eficiência do estudo *in vivo* por meio da utilização de linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, devido sua precisão, menor custo e além de ser compatível aos resultados obtidos em modelos animais.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, I. G. S. **Relatório de estágio em Farmácia Comunitária, relatório de estágio em Farmácia Hospitalar e monografia intitulada “Benefícios e riscos das plantas medicinais na Doença de Parkinson”**. 2018. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2018. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/84376/1/DOCUMENTO%20UNICOpdf.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ANJOS, V. R. **Modelo genético da doença de Parkinson baseado na sobreexpressão estriatal de alfa-sinucleína**. 2013. Dissertação (Medicina) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/25031/1/Tese%20de%20Mestrado%20Vanessa%20Anjos.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ARAGÃO, N. M. *et al.* **Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas**. Química nova, Ciências Exatas e da Terra, 2009. ISSN 0100-4042. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900043>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/T4tqVjSYpVQqyKn7tChQDxF/?lang=pt#>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ARAÚJO, C. M. C. A. *et al.* **AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA DE DIFERENTES EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Ocimum gratissimum* L. PARA A PRODUÇÃO DE UM FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO**. Conexão Fаметro 2017: Arte e Conhecimento XIII Semana Acadêmica, 2017. ISSN: 2357-8645. Disponível em: <https://doity.com.br/media/doity/submissoes/artigo-62d3cbfd070e7318727ea3c397d1d4f9029c8bde-arquivo.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- AUAD, P. **Composição química de taninos vegetais, curtimento e propriedades nos couros**. 2018. Dissertação (Engenharia). Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2018. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/185808>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* **Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo**. Química Nova, v. 29, n. 01, p. 113-123, 2006.
- BRITO, M. S. **PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DOS CAULES DE *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE)**. 2014. Dissertação (Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - Bahia, 2014. Disponível em: http://www2.uesb.br/ppg/ppgca/wp-content/uploads/2017/11/Disserta%C3%A7ao_Mateus.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.
- BERTOLAZI, A. A. **MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO ECTOMICORRÍZICO**. 2016. Tese (Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2017/02/Tese-Amanda-FINAL-.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.

CÂNDIDO, A. A. F. *et al.* **Efeitos da umidade sobre as características físicas de grãos de mucuna (*Mucuna pruriens*) e as propriedades bulk do leito fixo.** Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, jul. 2019. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobecic2019/FTSP40.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CASTAÑEDA, S. M. B. **Caracterização e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos da parte aérea de *Mucuna pruriens* var. *utilis*.** 2015. Dissertação (Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/7602/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CASTEJON, F. V. **TANINOS E SAPONINAS.** 2011. Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, Goiás, 2011. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/semi2011_Fernanda_Castejon_1c.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.

CUNHA, A. L. *et al.* **Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo.** Diversitas Journal, v. 1, n. 02, p. 175-181, mai./ago. 2016. ISSN 2525-5215. DOI 10.17648/diversitas-journal-v1i2.332. Disponível em: https://periodicos.ifal.edu.br/diversitas_journal/article/view/332/326. Acesso em: 20 jul. 2021.

DHANASEKARAN, M. *et al.* **Antiparkinson Drug – *Mucuna pruriens* shows Antioxidant and Metal Chelating Activity.** PHYTOTHERAPY RESEARCH, 2009. DOI 10.1002/ptr.2109. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.2109>. Acesso em: 01 ago. 2021.

DORNAS, W. C. *et al.* **Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 28, n.3, p. 241-249, 2007.

EMBRAPA. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Comportamento de leguminosas para adubação verde no submédio São Francisco.** Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE, jul. 2004. ISSN 1516-1641. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/154470/1/BPD63.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EMBRAPA. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).** Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, dez/2006. Comunicado Técnico. ISSN 1679-6535. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/664098/1/cot125.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EMBRAPA. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{●+}**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, jul/2007. Comunicado Técnico. ISSN 1679-6535. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

EMBRAPA. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, jul./2007. Comunicado Técnico. ISSN 1679-6535. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

FERRACINI-SANTOS, L. *et al.* **Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada**. Química Nova, v. 32, n. 02, p. 322-326, 2009. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/92214/1/2-s2.0-66749086334.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

FILHO, A. C. P. M.; CASTRO C. F. S. **IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES FITOQUÍMICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS ETANÓLICOS FOLIARES DE ESPÉCIES DO CERRADO GOIANO/GO, BRASIL**. Revista EIXO, Brasília, Distrito Federal, maio/ago. 2020, v. 09, n. 02. ISSN 2238-5630. Disponível em: <http://revistaeixo.ifb.edu.br/index.php/RevistaEixo/article/view/653/522>. Acesso em: 20 jul. 2021.

GONÇALVES, R. M. *et al.* **COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Calophyllum brasiliense*, *Mucuna pruriens* E *Piper regnellii***. VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Editora CESUMAR, Maringá, Paraná, out. 2011. ISBN 978-85-8084-055-1. Disponível em: http://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123456789/6374/1/renata_menoci_goncalves.pdf. Acesso em: 01 ago. 2021.

GUARIENTI, C. *et al.* **Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat**. Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 69, p. 106-111, 2010. Disponível em: <http://www.repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/4394/Capacidade%20antioxidante%20da%20microalga%20Spirulina%20platensis%20em%20c%3a9lulas%20da%20levedura%20Saccharomyces%20cerevisiae%20submetidas%20ao%20estressor%20paraquat.pdf?sequence=1>. Acesso em: 01 ago. 2021.

IFEMEJE, J. C. **Chemical and Phytochemical Compositions of *Mucuna Pruriens* Leaves**. African Journal of Science and Research, 2016. ISSN: 2306-5877. Disponível em:

https://web.archive.org/web/20180421163813id_/http://ajsr.rstpublishers.com/pdf_files/all/ajsr_a_8449_edit%205.pdf. Acesso em: 01 ago. 2021.

I LAUX; A. NEL. **Evidências de que a apoptose induzida por estresse oxidativo pela menadiona envolve vias dependentes de Fas e independentes de Fas.** ELSEVIER - Imunologia Clínica, v. 101, ed. 03, p. 335-344, dez. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5129>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661601951290?via%3Dihub>. Acesso em: 01 ago. 2021.

JIMOH, M. A. *et al.* **Cytotoxicity, Phytochemical, Antiparasitic Screening, and Antioxidant Activities of *Mucuna pruriens* (Fabaceae).** Plants 2020, v. 09, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9091249>. Disponível: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/9/1249/htm#>. Acesso em: 01 ago. 2021.

JURI, C. C.; CHANÁ, C. **Levodopa en la enfermedad de Parkinson.** Revista Méd Chile, v. 134, p. 893-901, 2006. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v134n7/art14.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

KUMAR, D. S *et al.* **In vitro antioxidant activity of various extracts of whole plant of *Mucuna pruriens* (Linn).** International Journal of PharmTech Research. Nagar, Índia, v. 02, n. 03, p. 2063-2070, 2010. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103248529>. Acesso em: 01 ago. 2021.

LIEU, C. A. *et al.* **A Water Extract of *Mucuna pruriens* Provides Long-Term Amelioration of Parkinsonism with Reduced Risk for Dyskinesias.** HHS Author Manuscripts, v. 16, p. 458-465, 2010. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2010.04.015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909380/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LIMA, A. A. *et al.* **Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, p. 337-348, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/a/HcNcnkYpffCpK58pkrXQCxc/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LOPES, A. A. *et al.* **Avaliação da Administração Crônica de *Mucuna pruriens* sobre Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos e de seus Efeitos Neuroprotetores, em Modelo de Doença de Parkinson.** Revista Fitos. Farmacologia/Pharmacology. Jacarepaguá, Rio de Janeiro, v. 07, n. 01, p. 37-43, jan./mar. 2012. ISSN 1808-9569. Disponível em: http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/5741/1/2012_art_aalopes.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

LONGHI, J. G. **Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens*.** 2007. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, 2007. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13867/dissertacaojoylonghi.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MEDINA, A. L. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*)**. 2009. Dissertação (Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: http://www.dcta.create.inf.br/manager/uploads/documentos/dissertacoes/MEST_ALI_NE_LISBOA_MEDINA_.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

MONTEIRO, A. R. S. **Uso de *Saccharomyces cerevisiae* para estudo de organismos procariotos**. 2006. Dissertação (Genética) - Departamento de Biologia Geral Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006. Disponível em: <http://pggenetica.icb.ufmg.br/defesas/44M.PDF>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MOTTA, E. V. S. *et al.* **Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Ciências Agrárias, Ciências Biológicas, Paulínia, São Paulo, jun. 2013. ISSN 1516-0572. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/Bbs9dcXML8LDzXQmXL4WfSw/?lang=pt#>. Acesso em: 01 ago. 2021.

MOURA, G. A. *et al.* **EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E ANÁLISE DE L-DOPA EM SEMENTES DE MUCUNA**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, São Paulo, São Paulo, set. 2018. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2018/PT.0683.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

NWAOGUIKPE, R. N. *et al.* **The Effects of Processing on the Proximate and Phytochemical Compositions of *Mucuna pruriens* Seeds (Velvet Beans)**. Pakistan Journal of Nutrition, v. 10, p. 947-951, 2011. ISSN 1680-5194. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ujowundu-Cosmas/publication/266907639_The_Effects_of_Processing_on_the_Proximate_and_Phytochemical_Compositions_of_Mucuna_pruriens_Seeds_Velvet_Beans/links/55d280ad08ae7fb244f53fb0/The-Effects-of-Processing-on-the-Proximate-and-Phytochemical-Compositions-of-Mucuna-pruriens-Seeds-Velvet-Beans.pdf. Acesso em: 01 ago. 2021.

PEREZ, E. **OBTENÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Mucuna pruriens* (L.) DC. E CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO CONTENDO *Boswellia serrata* ROXB.: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR CLAE**. 2009. Tese (Química) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, 2009. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/23817/tese%20Elisa%20Perez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 ago. 2021.

PERFEITO, R.; REGO, A. C. **Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson**. Revista Neurociência, v.20, p. 273-284, 2012. Disponível em: <https://periodicos.unifesp.br/index.php/neurociencias/article/view/8280/5811>. Acesso em: 01 ago. 2021.

RABELO, D. M. **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE in vitro e in vivo EM BEBIDAS DE CAFÉ: INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXTRAÇÃO.** 2014. Dissertação (Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Belo Horizonte, Minas Gerais, 2014. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-9XTH2X/1/rabelo__dm__determina__o_da_atividade_antioxidante_in__vitro_e_in_vivo_em__bebidas_de_caf____influ_ncia_do_tipo_de__extra__o.pdf. Acesso em: 01 ago. 2021.

RIBEIRO, R. P. **DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CLAE-EM/EM.** 2014. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, 2014. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/63469/R%20-%20D%20-%20ROMULO%20PEREIRA%20RIBEIRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 ago. 2021.

SAAD, G. A. *et al.* **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, ed. 02, 2018. ISBN 978-85-277-3042-6.

SEGOVIA, V. C. **AGREGAÇÃO DE ALFA-SINUCLEÍNA NA DOENÇA DE PARKINSON: IMPORTÂNCIA DO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.** 2018. Tese (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, 2018. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/70618/R%20-%20T%20-%20VALENTIN%20COPPOLA%20SEGOVIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 ago. 2021.

SILVA, F. C. *et al.* **Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica.** 2014. Revista Virtual Química, v. 06, n. 05, 2014. ISSN: 1984-6835. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/631>. Acesso em: 25 nov. 2021.

SOARES, D. G. *et al.* **Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, v. 41, n. 1, p. 95-100, jan./mar. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/6vVQG95ptQvxQXpZvkwjvwJ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 01 ago. 2021.

SOARES, D. M. M. **L- DOPA extradiol dioxigenase de *Amanita muscaria*: revisão da sequência codificadora, expressão heteróloga, caracterização funcional e contextualização filogenética.** 2019. Tese (Bioquímica) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <http://docplayer.com.br/165171717-Douglas-moraes-mendel-soares.html>. Acesso em: 25 nov. 2021.

SOARES, N. P. *et al.* **Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas.** Enciclopédia biosfera, Centro

Científico Conhecer, Goiânia, v. 13, n. 24, 2016. DOI 10.18677/EnciBio_2016B_094. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2016b/agrarias/Tecnica%20de%20prospeccao.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SOUZA, W. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS VEGETAIS**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campo Mourão, Paraná, 2013. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6514/2/CM_COALM_2013_1_10.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

TAVARES, R. L. *et al.* **Nutrition composition, phytochemicals and microbiological quality of the legume, *Mucuna pruriens***. African Journal of Biotechnology, v. 14, p. 676-682, feb. 2016. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/94273CE50689>. Acesso em: 20 jul. 2021.

TEIXEIRA, J. B. *et al.* **AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA DE EXTRATOS DA FOLHA E CAULE DA *SPONDIAS PURPÚREA L. (SERIGUELA)* – UM ESTUDO PRELIMINAR**. Congresso Internacional da diversidade do semiárido, 2016. Disponível em: https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conidis/2016/TRABALHO_EV064_M D1_SA10_ID2404_21102016001056.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. **A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson**. RBCEH, Passo Fundo, v. 12, n. 3, p. 288-298, set./dez. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5335/rbceh.v12i3.6006>. Disponível em: <http://seer.upf.br/index.php/rbceh/article/view/6006/pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 2010. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102010-101541/publico/Ana_Paula_Tiveron.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.

URREA-VICTORIA, V. *et al.* **Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, set. 2016. ISBN 978-85-85658-62-5. Disponível em: https://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=66&Itemid=9. Acesso em: 20 jul. 2021.

VIDAL, N. N. M.; SILVA-LOPEZ, R. E. ***Mucuna pruriens* (L.) DC (Leguminosae)**. Revista Fitos, Estudo da arte, Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 05, n. 03, set. 2010. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/15843/2/32.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZAMPOL, M. A. **Efeito de antioxidantes naturais em modelos parkinsonianos de *saccharomyces cerevisiae***. 2015. Dissertação (Ciências, Microbiologia) -

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-24052014-122243/publico/MarianaAlbaZampol_Mestrado_I_C.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.