

Avaliação da extração sólido-líquido de levodopa a partir de sementes de mucuna utilizando diferentes solventes

Evaluation of solid-liquid extraction of levodopa from mucuna seeds using different solvents

Article Info:

Article history: Received 2023-12-03 / Accepted 2024-01-20 / Available online 2024-02-09

doi: 10.18540/jcecv110iss2pp18218



Rita de Cássia Superbi de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1156-4667>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: rita.sousa@ufv.br

Giovani da Silva Quieli

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3609-1612>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: giovani.quieli@ufv.br

Thais Pinto Coelho Monteiro

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-0474-3643>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: thais.monteiro@ufv.br

Angélica Ribeiro da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5443-7537>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: costa.angelicaribeiro@gmail.com

Jordana Benfica

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6437-1383>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: jordanabenfica@ua.pt

Resumo

A levodopa é a principal droga utilizada atualmente no tratamento da doença de Parkinson. Esse aminoácido, encontrado na semente de mucuna, é um precursor direto da dopamina, que atua na redução e controle dos sintomas da doença. A levodopa comercializada é produzida de forma sintética, no entanto, devido a relevância do tema, estudos têm sido feitos para encontrar alternativas de extração desse composto a partir de fontes naturais, tornando o processo mais econômico e sustentável com o uso de solventes alternativos. Neste estudo, o objetivo foi caracterizar as sementes de mucuna cinza (*Mucuna cinerea*) e avaliar o rendimento da extração sólido-líquido de levodopa, utilizando diferentes solventes (ácido benzoico, ácido succínico, cloreto de colina, etanol, PEG 4000 e água). Para avaliar quais solventes e fatores que mais influenciavam no rendimento de extração, um delineamento fatorial (2^3) foi realizado. Os fatores foram a temperatura, tempo de extração e a razão entre sólido e solvente. A análise da composição mostrou que a mucuna é rica em proteínas com 26,49% e carboidratos com 50,63%, tem 10,16% de minerais, 4,08% de lipídeos e 8,64% de umidade. A quantificação da levodopa foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo mistura aquosa de água e etanol 50% m/m o solvente mais indicado para a extração, alcançando o rendimento de 14,14%.

Palavras-chave: Extração sólido-líquido. Levodopa. Solvente. Mal de Parkinson.

Abstract

Levodopa is the main drug currently used to treat Parkinson's disease. This amino acid, found in the mucuna seed, is a direct precursor to dopamine, which acts to reduce and control of disease's symptoms. The commercially available levodopa is produced synthetically, however, due to the relevance of the topic, studies have been carried out to find alternatives for extracting this compound from natural sources, making the process more economical and sustainable with the use of alternative solvents. In this study, the objective was to characterize the seeds of gray mucuna (*Mucuna cinerea*) and evaluate the solid-liquid extraction yield of levodopa, using different solvents (benzoic acid, succinic acid, choline chloride, ethanol, PEG 4000 and water). To evaluate which solvents and factors most influenced the extraction yield, a factorial design (2^3) was carried out. The factors were temperature, extraction time and the ratio between solid and solvent. Composition analysis showed that mucuna is rich in proteins with 26.49% and carbohydrates with 50.63%, has 10.16% minerals, 4.08% lipids and 8.64% moisture. Levodopa was quantified using high-performance liquid chromatography, with an aqueous mixture of water and ethanol 50% m/m being the most suitable solvent for extraction, achieving a yield of 14.14%.

Keywords: Solid-liquid extraction. Levodopa. Solvent. Parkinson's disease.

1. Introdução

O Mal de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma diminuição da produção de dopamina e tem como principais sintomas o tremor em repouso, mudança de posturas e lentidão de movimentos (Katzenschlager *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2021). No entanto, como a dopamina é um neurotransmissor que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ela não é usada diretamente para o tratamento da doença (Hu *et al.*, 2010). A levodopa é um aminoácido precursor da dopamina que pode atravessar essa barreira, atingindo o sistema nervoso central (Mu *et al.*, 2015). Portanto, o principal tratamento para os sintomas da doença de Parkinson envolve a administração de levodopa sintética. No entanto, um dos efeitos colaterais comuns da administração desta medicação é a discinesia (movimento muscular involuntário induzido por drogas) (Benfica, *et al.* 2020).

A principal fonte natural da qual a levodopa pode ser extraída são as sementes de *Mucuna pruriens* (Damodaran; Ramaswamy, 1937; Katzenschlager *et al.*, 2004). Anosike *et al.* (2019) extraíram levodopa de sementes de mucuna utilizando metanol como solvente, resultando em um extrato contendo 12,16% de levodopa. Rane *et al.* (2019) usaram uma mistura de acetonitrila e metanol combinados ao ultrassom e extraíram levodopa de diferentes tipos de mucuna, reportando rendimentos até 7,61%. Misra e Wagner (2007) obtiveram concentrações até 6% de levodopa usando uma mistura etanol:água na presença de ácido ascórbico e clorofórmio. Observa-se que a ampla gama de concentrações não permite uma estimativa precisa do teor de levodopa em amostras individuais de mucuna.

Pode-se notar que, em grande parte dos estudos aplicados a processos de extração sólido-líquido, são utilizados solventes orgânicos tóxicos como metanol, hexano, acetona e clorofórmio, devido às suas características de polaridade, solubilidade e alta capacidade de extração. Entretanto, a recuperação desses compostos naturais tem muitos inconvenientes, como problemas associados à alta toxicidade, elevada volatilidade e baixa seletividade e, na maioria dos casos, com a necessidade de eliminação total do solvente (Benfica *et al.*, 2021). A substituição de solvente é um estudo relevante para processos industriais com menores impactos ao ambiente. É importante encontrar solventes que promovam elevados rendimentos de extração tendo, ao mesmo tempo, baixa toxicidade, alta estabilidade térmica e biodegradabilidade (Rane *et al.*, 2019; Chemat *et al.*, 2019).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura, Benfica *et al.* (2022, 2021) apresentaram uma alternativa eficaz no processo de extração de levodopa utilizando solventes alternativos como solventes eutéticos com base em ácidos carboxílicos ou polióis combinados com cloreto de colina, encontrando rendimentos de extração de até 9,9%.

Estudos relatam o uso de compostos biodegradáveis, incluindo ácidos carboxílicos e polímeros (Liu *et al.*, 2013) em sistemas de extração sendo solventes aprovados e usados em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos.

Neste trabalho foram utilizados diferentes solventes extratores (ácido benzoico, ácido succínico, cloreto de colina, etanol, PEG 4000 e água) e avaliadas diferentes condições experimentais (temperatura, razão sólido/solvente e tempo de extração) na extração de levodopa a partir de sementes de mucuna.

2. Metodologia

Sementes de *Mucuna cinerea* foram adquiridas da empresa de comercialização de sementes Brseeds Sementes, grau de pureza 99%. As sementes foram moídas em um moinho do tipo Willye TE-650 do Laboratório de Agroecologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa) até uma granulometria de 1,18 mm. Os experimentos para a extração da levodopa das sementes de mucuna foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Química da UFV. Os equipamentos utilizados foram previamente calibrados de forma a reduzir os erros instrumentais. No preparo das soluções de solventes, os compostos foram pesados em balança analítica (Bel M214-AIH), com quatro casas decimais e diluídos em água ultrapura Milli-Q, até a obtenção de uma solução homogênea.

2.1 Caracterização físico-química

Foram determinadas a umidade, teor de cinzas, teor de lipídeos, teor de proteínas e teor de carboidratos das sementes de mucuna moídas. A amostra foi formada por uma porção de mucuna de cada granulometria obtida, de forma que minimize os efeitos do tamanho dos grãos. As análises de umidade, cinzas e lipídeos seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação de proteínas foi baseada no método de digestão Kjeldahl. A quantidade de carboidratos, a qual foi determinada por diferença.

2.2 Extração sólido-líquido

Para a realização dos procedimentos experimentais, diferentes tipos de solventes foram preparados em concentrações de acordo com o planejamento experimental. Os solventes e suas respectivas concentrações foram: i) ácido benzoico, 0,29% m/m; ii) ácido succínico, 8,30% m/m; iii) cloreto de colina (ChCl), 50% m/m; iv) etanol 50% m/m; v) PEG 4000, 12% m/m e vi) água.

Com o objetivo de determinar as condições experimentais que correspondam ao máximo rendimento de extração da levodopa (RD), neste trabalho fez-se uma exploração dos fatores que poderiam influenciar no rendimento: temperatura (°C), razão sólido/solvente e o tempo de extração (min). Os níveis e os fatores tiveram sua influência analisados por meio do planejamento fatorial completo (2^3), com triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios para cada solvente. Os níveis reais e codificados estão representados na Tabela 1. Os resultados foram analisados estatisticamente a um nível de confiança de 95%. Os modelos foram testados pela ANOVA, observando a falta de ajustamento e coeficiente de determinação (R^2) com o teste F, e os coeficiente do modelo foram testados pelo teste t de Student. A matriz de planejamento para o delineamento proposto está representada pela Tabela 2.

Tabela 1 – Níveis dos fatores no planejamento experimental.

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	35	50	65
Razão sólido /solvente (% m/m)	20	30	40
Tempo de extração (min)	10	20	30

Tabela 2 – Matriz do delineamento (2³+3) e os valores codificados dos fatores para a extração da levodopa.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólido /solvente (% m/m)	Tempo de extração (min)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

As massas de mucuna para cada experimento foram pesadas em balança analítica, utilizando frascos previamente identificados. Em seguida, as massas de cada solvente foram adicionadas aos frascos e pesados com a mucuna, de modo a obter a razão sólido/solvente desejada. Cada frasco foi mantido a temperatura constante, sob agitação, em chapa de aquecimento (IKA® C-MAG HS 10), conforme o planejamento para cada experimento. Após o tempo de extração, uma alíquota de 10 µL de cada extrato foi retirada com pipeta automática e diluída em 4990 µL de água deionizada em outro frasco previamente identificado. As amostras diluídas foram congeladas até a sua quantificação por cromatografia.

A quantificação de levodopa foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os experimentos foram realizados no LASA (Laboratório de Síntese de Agroquímicos) da UFV, com o equipamento Shimadzu LC10AD. Para a quantificação da levodopa, inicialmente foi feita uma curva analítica. As soluções padrão de levodopa (Sigma-Aldrich) foram preparadas com concentrações variando de 0,0372 a 0,0900 g L⁻¹. A fase móvel usada no cromatógrafo foi uma solução com concentração de 1 % v/v de ácido acético em água deionizada. Para a leitura das soluções dos padrões de levodopa, 20 µL foram injetados na coluna C18, com fluxo de 0,800 mL min⁻¹ da fase móvel, e detectada em leitor UV com comprimento de onda de 280 nm, a temperatura ambiente. Após as leituras das soluções dos padrões no cromatógrafo foi possível elaborar uma curva analítica. As leituras das amostras foram realizadas, sob as mesmas condições realizadas com as soluções dos padrões no cromatógrafo. A partir das áreas dos picos obtidas, foi possível calcular a concentração de levodopa extraída de cada amostra.

O cálculo do rendimento da extração (RD) foi feito de acordo com a Equação 1.

$$RD = \frac{C \cdot V_1 \cdot m_2}{V_2 \cdot m_1 \cdot \rho} * 100 \quad (1)$$

Em que, RD é o rendimento da extração (%); C é a concentração de levodopa no extrato, obtida a partir da curva analítica com a absorvância da amostra (g L⁻¹); V₁ o volume de amostra (µL); V₂ a alíquota do extrato (µL); m₁ a massa de mucuna (g); m₂ a massa de solvente (g); ρ a densidade do solvente (g L⁻¹).

3. Resultados e discussão

Neste trabalho foram avaliados diferentes solventes, de baixo custo e biocompatíveis, para extração de levodopa a partir de biomassa sob a influência de diferentes fatores: temperatura, razão sólido/líquido e tempo de extração.

3.1 Caracterização físico-química

Na Tabela 3 está apresentada a composição das sementes de mucuna

Tabela 3 – Caracterização físico-química das sementes de mucuna.

Componente	Teor (% m/m)
Carboidratos	50,63
Proteínas	26,49
Lipídios	4,08
Cinzas	10,16
Umidade	8,64

Souza *et al.* (1991) realizaram a caracterização de sementes de mucuna-anã (*Stizolobium deeringianum*) e obtiveram resultados de 39,00% para amido, 26,70% para proteínas, 4,97% para cinzas, 7,48% para fibras e 11,96% para umidade. Aware *et al.*, (2017) encontraram 12,3% de carboidratos, sendo 2,9% de amido, 9,07% de proteínas, 2,3% de cinzas, 7,48% de fibras e 1,12% de lipídeos para as sementes de mucuna macrocarpa. Nwaoguikie; Braide; Uwaoguikie, (2011) estudaram o efeito do processamento na composição fitoquímica da *M. pruriens* descascada, e encontraram 60,03% de carboidratos, 5,26% de cinzas, 3,86% de fibras, 28,23% de proteínas, 2,69% de lipídeos e 12,32% de umidade. A comparação destes trabalhos indica a tendência de mucunas, independente da espécie, apresentarem teores consideráveis de proteínas, o que é um bom indicativo para a escolha desta semente para a extração de levodopa; além de indicar baixos teores para lipídios. As diferenças dos resultados obtidos entre os trabalhos podem ser explicadas pela espécie de mucuna, além da forma de cultivo e o clima, e da metodologia utilizada na determinação dos parâmetros.

3.2. Extração sólido-líquido

Os resultados de rendimento de extração de levodopa, obtidos experimentalmente de acordo com o planejamento estatístico estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Rendimentos de extração de levodopa para os solventes em estudo.

Ensaio	T (°C)	Razão S/S (% /m)	Tempo (min)	Ácido benzoico	Ácido succínico	Água	ChCl	Etanol	PEG 4000
1	35	20	10	6,65	7,35	8,00	3,76	7,85	4,06
2	65	20	10	10,97	12,43	5,32	2,81	4,52	4,31
3	35	40	10	4,90	6,20	3,13	2,54	14,14	3,89
4	65	40	10	9,43	9,99	5,57	3,31	4,73	5,33
5	35	20	30	8,13	9,93	7,11	4,85	5,98	4,06
6	65	20	30	10,48	11,19	19,27	3,55	4,83	7,75
7	35	40	30	8,07	8,97	8,17	5,06	5,87	4,90
8	65	40	30	4,90	7,69	9,35	2,25	7,09	8,06
9	50	30	20	8,92	7,81	6,46	3,18	5,95	5,30
10	50	30	20	8,50	8,50	7,34	2,57	6,08	6,75
11	50	30	20	9,06	8,94	6,91	1,79	3,84	6,07

Observa-se pela Tabela 4 que o maior valor de rendimento de extração foi de 19,27% usando água como solvente. No entanto, este valor não está condizente com a faixa de teores de levodopa encontrados para mucuna e já reportados em literatura (Benfica *et al.* 2020, 2021; Anosike *et al.*, 2019; Rane *et al.*, 2019). Possivelmente a água foi um solvente não seletivo que permitiu a extração de outros compostos que interferiram na quantificação da levodopa. Além disso, a água é um solvente que, por ter relativamente um alto ponto de ebulição, implicaria em alto gasto energético na

sua separação. O segundo solvente que apresentou melhor rendimento (14,14%) foi a solução alcóolica de etanol a 50% m/m por ser um solvente também bastante polar, apresentando o grupo funcional hidroxila. Em seguida, os rendimentos foram de 12,43% para a solução de ácido succínico e 10,97% para a solução de ácido benzoico. Provavelmente, este fato é devido a esses compostos apresentarem o grupo carboxila, como a levodopa, sendo que o ácido succínico apresenta duas carboxilas e o ácido benzoico apenas uma, indicando um maior rendimento de extração usando o primeiro. A solução de PEG 4000 e a de cloreto de colina apresentaram menores rendimentos de extração (8,06% e 5,06%, respectivamente). Para determinar quais fatores foram significativos, um diagrama de Pareto para cada solvente foi plotado, com um nível de significância de 5%, apresentados na Figura 1.

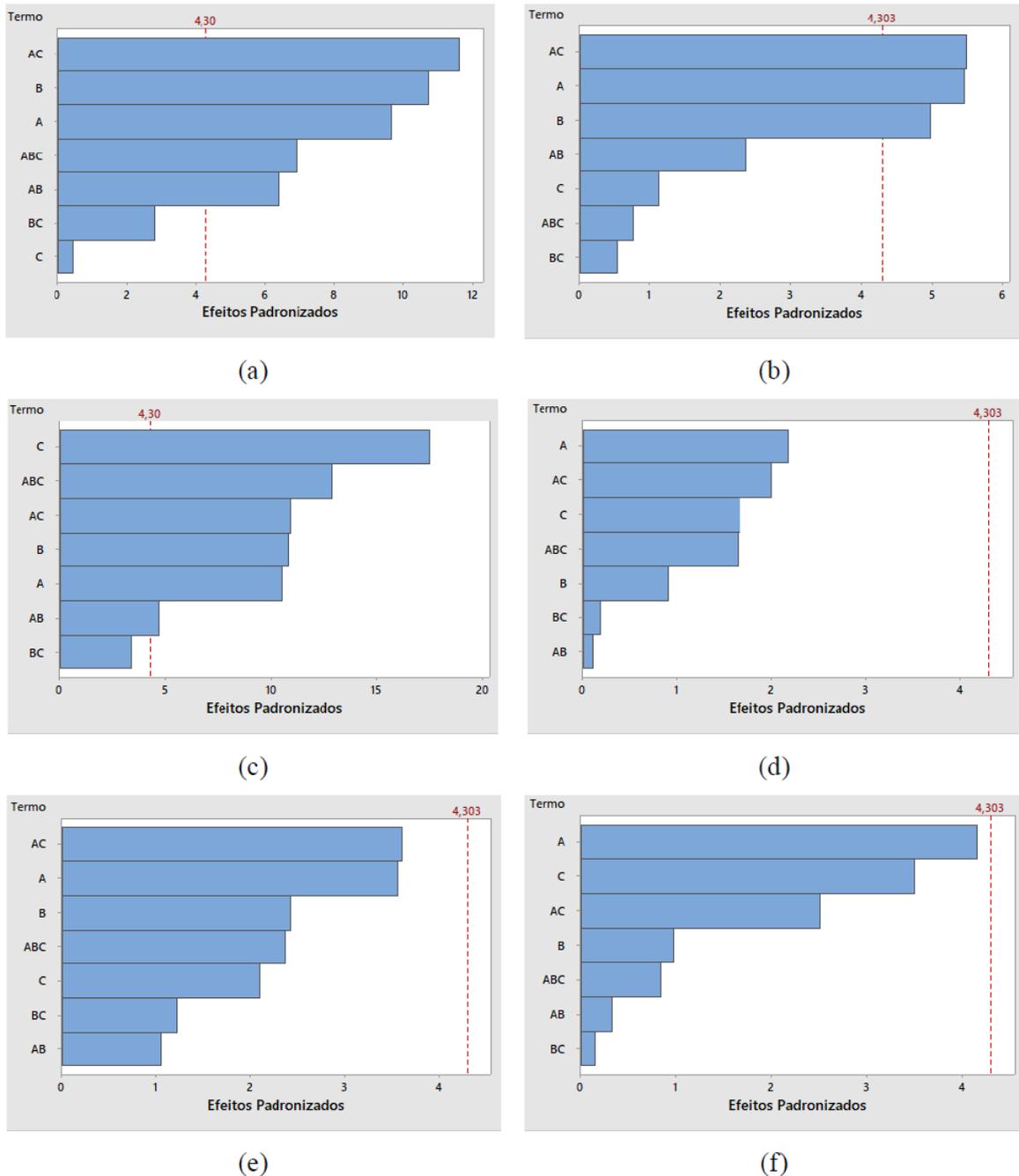


Figura 1 - Diagramas de Pareto para rendimento de extração utilizando os solventes: (a) ácido benzoico, (b) ácido succínico, (c) água, (d) cloreto de colina, (e) etanol, (f) PEG 4000. Fator A = T, B = R: razão sólido/solvente e C = t_p : tempo de extração

Como pode ser visto nos diagramas de Pareto, nem todos os fatores foram significativos para todos os solventes, ou seja, influenciaram a variável resposta, rendimento de extração. Nota-se que apenas houve fatores significativos para a extração utilizando ácido benzoico, ácido succínico e água. As análises de variância (ANOVA) foram realizadas para cada solvente, indicando os fatores que foram significativos a um nível de 5 % de significância. Um modelo completo (Equação 2) foi testado para todos os solventes.

$$RD = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 R + \beta_3 t_p + \beta_4 T * R + \beta_5 T * t_p + \beta_6 R * t_p + \beta_7 T * R * t_p \quad (2)$$

Em que, RD é o rendimento de extração, T é a temperatura (°C), R a razão sólido/solvente, t_p o tempo de extração (min).

Para o ácido benzoico, o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,996, indicando que a maior porcentagem da variação foi explicada pelo modelo (Equação 3).

$$RD = 5,93 + 0,0739T + 0,3101R + 0,231t_p + 0,000514T * R + 0,00629T * t_p + 0,021R * t_p + 0,000479T * R * t_p \quad (3)$$

Como pode ser observado, os fatores que influenciaram a resposta, em ordem decrescente de grandeza, foram interação entre temperatura e tempo, razão sólido/solvente, temperatura, interação entre os três fatores e interação entre temperatura e razão sólido/solvente.

Na extração com o ácido succínico, os seguintes fatores foram significativos: interação entre temperatura e tempo, temperatura e razão sólido/solvente. O coeficiente de determinação foi 0,871, o modelo está apresentado na Equação 4.

$$RD = 0,47 + 0,2220T - 0,1007R + 0,393t_p - 0,00741T * t_p \quad (4)$$

O modelo que descreve o rendimento de extração utilizando a água como solvente está apresentado abaixo (Equação 5), e obteve bom coeficiente de determinação igual a 0,998. O fator que mais influenciou a resposta foi o tempo, seguido da interação entre os três fatores, interação entre temperatura e tempo, razão sólido/solvente, temperatura e interação entre temperatura e razão sólido/solvente.

$$RD = 43,38 - 0,7748T - 1,158R - 2,145t_p + 0,02192T * R + 0,05111T * t_p + 0,06174R * t_p - 0,001341T * R * t_p \quad (5)$$

Para o solvente PEG4000, somente os fatores tempo de extração e temperatura influenciaram no rendimento de extração. O modelo está apresentado na Equação 6, com R^2 igual a 0,855.

$$RD = 4,44 - 0,0148T - 0,125t_p + 0,00429T * t_p \quad (6)$$

5. Conclusão

A semente de *Mucuna cinerea* foi caracterizada quanto a sua composição físico-química. Pela análise da composição química, concluiu-se que a mucuna é composta por mais de 75% de carboidratos e proteínas. A mistura etanol:água 50% foi a que apresentou melhores resultados para extração da levodopa. As variáveis estudadas (temperatura, razão sólido/solvente e tempo de extração) tiveram influência no rendimento na extração utilizando a solução saturada de ácido benzoico, a solução saturada de ácido succínico, a água deionizada e a solução de PEG 4000.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Referências

- Angumeenal, A.R. & Venkappayya, D. (2013). An overview of citric acid production. *LWT Food Sci. Technol.*, 50 (2), 367–370. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>.
- Anosike, C.A. Igboegwu, O.N., & Nwodo, O.F.C. (2019). Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *J. Tradit. Complement. Med.*, 9 (4), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.002>.
- Aware, C., Patil, R., Gaikwad, S., Yadav, S., Bapat, V., & Jadhav, J. (2017). Evaluation of L-dopa, proximate composition with in vitro anti-inflammatory and antioxidant activity of *Mucuna macrocarpa* beans: A future drug for Parkinson treatment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1097–1106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apitb.2017.10.012>.
- Benfica, J., Miranda, J. S., Morais, E. S., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P., & Sousa, R. C. S. (2020). Enhanced extraction of levodopa from *mucuna pruriens* seeds using aqueous solutions of eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(17), 6682–6689. doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00196>.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Trends in Analytical Chemistry Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges, *Trends Anal. Chem.* 118, 248–263, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>.
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017) Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chem. Cent. J.* 1–9. doi: <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>.
- Damodaran, M., & Ramaswamy, R. (1937). Isolation of l-3:4-dihydroxyphenylalanine from the seeds of *Mucuna pruriens*. *Biochemical Journal*, 31(12), 2149–2152.
- Dhillon, G.S., & Brar, S.K. (2011). Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 505–529. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0399-0>.
- Gomes, A. B. S., Granja, B. D. A. M., Melo, K. P. C. D. A., da Silva, T. F. H., & de Oliveira, J. S. (2021). Benefícios do tratamento não farmacológico junto à levodopa no tratamento da doença de Parkinson Benefits of non-pharmacological treatment with levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Brazilian Journal of Development*, 7(6), 56727-56740.
- Hu, G., Chen, L., Guo, Y., Wang, X., & Shao, S. (2010). Selective determination of L-dopa in the presence of uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticle self-assembled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode. *Electrochimica Acta*, 55 (16), 4711–4716. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.03.069>.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p.
- Katzenshlager, R., Evans, A., Manson, A., Palsalos, P. N., Ratnaraj, N., Watt, H., Timmermann, L., Van Der Giessen, R., & Lees, A. J. (2004). *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry*, 75, 1672–1677. doi: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028761>
- Liu, Q., Zhang, S., Zhu, D., Tang, X., Che, Y., & Feng, X. (2020). The parthenolide derivative ACT001 synergizes with low doses of L-Dopa to improve MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Research*, 379, 112337. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112337.
- Lutz, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: [s.n.], 2008.
- Meng, Z., Zhao, J., Duan, H., Guan, Y., & Zhao, L. (2018). Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from pollen typhae by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161, 246–253. doi: 10.1016/j.jpba.2018.08.048
- Misra, L., & Wagner, H. (2007). Extraction of bioactive principles from *Mucuna pruriens* seeds. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 44(1), 56–60.
- Mu, C., Zhang, Q., Wu, D., Zhang, Y., & Zhang, Q. (2015). Simultaneous quantification of catecholamines in rat brain by high-performance liquid chromatography with on-line gold

- nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence detection. *Biomedical Chromatography*, 29(1) 148–155. doi: 10.1002/bmc.3252.
- Nwaoguiké, R. N., Braide, W., & Ujowundu, C. O. (2011). The Effects of Processing on the Proximate and Phytochemical Compositions of *Mucuna pruriens* Seeds (Velvet Beans). *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(10), 947–951. doi:10.3923/pjn.2011.947.951
- Perez, E. (2009). *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*. 153 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Rane, M., Suryawanshi, S., Patil, R., Aware, C., Jadhav, R., Gaikwad, S., Singh, P., Yadav, S., Bapat, V., Gurav, R., & Jadhav, J. (2019). Exploring the proximate composition, antioxidant, anti-Parkinson's and anti-inflammatory potential of two neglected and underutilized *Mucuna* species from India. *South African J. Bot.* 124, 304–310. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.030>
- Souza, P. A., Souza, H., Durigan, J. F., & Faleiros, R. (1991). Caracterização Física e avaliação Química e Bioquímica de Grãos de *Mucuna Anã* (*Stizolobium deeringianum*). *Alimentos e Nutrição*, 3, 29-38, São Paulo.
- Tang, B., Zhang, H., & Row, K. H. (2015). Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* 38, 1053–1064. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114047>
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 545–552. Doi: <https://doi.org/10.1007/s002530051431>.