

**JOY GANEM LONGHI**

**Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lys Mary Bileski Cândido

Co-orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

**CURITIBA**

**2007**

## TERMO DE APROVAÇÃO

**JOY GANEM LONGHI**

Título: "**Atividade biológica da semente de  
*Mucuna pruriens*"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Profa. Dra. Lys Mary Bileski Cândido  
Orientadora

  
Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão  
Universidade Estadual de Londrina

  
Profa. Dra. Márcia do Rocio Duarte  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 20 de junho de 2007.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre lutaram para que eu  
pudesse alcançar os mais altos vãos....

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelos exemplos de dedicação, força, coragem e pelo amor a mim dedicado em todas as etapas de minha vida.

Ao meu namorado Flávio, pela compreensão, carinho e ajuda.

À família Berckembrock, por me receberem como irmã e filha quando estou longe de minha família.

Aos meus orientadores, pelo apoio, paciência e ensinamentos repassados. Em especial, à professora Lys Mary, que pôde me ensinar muito mais do que ciência.

Às minhas amigas Jeanine, Patrícia e Marcela, por me incentivarem e auxiliarem nos momentos difíceis.

À professora Maria Vital, pelo entusiasmo e dedicação de orientadora a mim prestada.

À professora Almeriane, pelo incentivo nas horas difíceis.

Às colegas de Pós Graduação dos diferentes departamentos em que trabalhei, Maria Izabel, Elisa, Caroline e Adriana, pela ajuda em todos os momentos necessários.

Ao Hospital Erasto Gaertner e em especial à minha supervisora Heloísa, por compreender a importância deste trabalho em minha vida.

Aos técnicos de laboratório Jair e Lindamir e às alunas de iniciação científica Celine e Cristiane Ziemer e Cristiane Lima, pela ajuda constante.

Aos meus amigos do plano espiritual, que me auxiliam e zelam por mim.

A todos aqueles que em algum momento desta pesquisa, contribuíram para o meu crescimento científico e humano.

## EPÍGRAFE

***“ Todas as boas máximas se encontram no mundo,  
Só falhamos ao aplicá-las”***

B. Pascal

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>03</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>04</b>
3.1 <i>Mucuna pruriens</i> E SUBSTÂNCIAS ASSOCIADAS.....	04
3.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	08
3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres.....	08
3.2.2 Antioxidantes.....	14
3.2.2.1 Compostos fenólicos.....	15
3.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante.....	16
3.2.3.1 Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio.....	17
3.2.3.2 Ensaio de redução do radical livre DPPH.....	17
3.2.3.3 Ensaio da redução do radical ABTS.....	18
3.3 A DOENÇA DE PARKINSON E SEU TRATAMENTO.....	18
3.3.1 O Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson.....	20
3.3.1.1 O tratamento com levodopa.....	21
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
4.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA.....	24
4.2 FASES DA PESQUISA.....	24
4.2.1 Preparo dos Extratos.....	24
4.2.1.1 Extrato de etanólico de <i>Mucuna pruriens</i> .....	24
4.2.1.2 Extrato ácido de <i>Mucuna pruriens</i> .....	25
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	26
4.2.3 Avaliação da Ação de <i>Mucuna pruriens</i> em um Modelo Animal de Parkinsonismo.....	26
4.2.3.1 Avaliação da função motora – medida da atividade geral em campo aberto.....	27
4.2.3.1.1 Análise estatística.....	29
4.2.4 Quantificação de Fenólicos Totais no Extrato de <i>Mucuna pruriens</i> .....	29

4.2.5	Análise da Atividade Antioxidante da semente de <i>Mucuna pruriens</i> .....	30
4.2.5.1	Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio.....	30
4.2.5.2	Ensaio da redução do radical livre DPPH.....	31
4.2.5.3	Ensaio da redução do radical ABTS.....	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
5.1	PREPARO DOS EXTRATOS E IDENTIFICAÇÃO DA LEVODOPA.....	33
5.2	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA EM CAMUNDONGOS – MEDIDA DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO.....	36
5.3	CONCENTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	40
5.4	TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
5.4.1	Teste de Redução do Fosfomolibdênio.....	41
5.4.2	Ensaio de Redução do Radical Livre DPPH.....	43
5.4.3	Análise da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical ABTS.....	48
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1	- <i>Mucuna pruriens</i> .....	04
FIGURA	2	- ESTRUTURAS QUÍMICAS: L – 3 – CARBOXI – 6,7 – DIIDROXI – 1,2,3,4 – TETRAIDROISOQUINOLINA E 1– METIL – 3 – CARBOXI – 6,7 – DIIDROXI – 1,2,3,4 – TETRAIDROISOQUINOLINA .....	06
FIGURA	3	- FORMAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES.....	12
FIGURA	4	- SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	19
FIGURA	5	- FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA LEVODOPA E DA DOPAMINA.....	21
FIGURA	6	- CAMPO ABERTO.....	27
FIGURA	7	- CROMATOGRAMA DO EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES CINZAS DE <i>Mucuna pruriens</i> OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	34
FIGURA	8	- CROMATOGRAMA DO EXTRATO COM ÁCIDO ACÉTICO DE SEMENTES CINZAS DE <i>Mucuna. pruriens</i> OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	34
FIGURA	9	- CROMATOGRAMA DO EXTRATO COM ÁCIDO CÍTRICO DE SEMENTES PRETAS DE <i>M. pruriens</i> OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	35
FIGURA	10	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>Mucuna pruriens</i> AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO.....	42
FIGURA	11	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>Mucuna pruriens</i> AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO DPPH.....	44
FIGURA	12	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>Mucuna pruriens</i> AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS.....	50

**LISTA DE TABELAS**

TABELA	1	-	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	09
TABELA	2	-	VALORES DO EC <sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>M. pruriens</i> PRETA.....	45
TABELA	3	-	VALORES DO EC <sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DO PADRÃO DE LEVODOPA.....	46
TABELA	4	-	COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE EC <sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DOS PADRÕES DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES COM DIFERENTES PERFIS CINÉTICOS E OS VALORES DE EC <sub>50</sub> E ARP DO EXTRATO ÁCIDO DE SEMENTE PRETA DE <i>Mucuna. pruriens</i> E DO PADRÃO DE LEVODOPA.....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	-	VARIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO DOS ANIMAIS EM CAMPO ABERTO.....	37
GRÁFICO 2	-	FREQÜÊNCIA DE LEVANTAR EM CAMPO ABERTO.....	38
GRÁFICO 3	-	TEMPO DE IMOBILIDADE, MENSURADA EM SEGUNDOS, DOS ANIMAIS OBSERVADOS EM CAMPO ABERTO.....	39
GRÁFICO 4	-	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO TÂNICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	40
GRÁFICO 5	-	CURVA DE CALIBRAÇÃO FEITA COM A VITAMINA C E EQUAÇÃO DE RETA FORMADA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO.....	43
GRÁFICO 6	-	EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DA EC <sub>50</sub> DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>M. pruriens</i> PRETA.....	45
GRÁFICO 7	-	EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DA EC <sub>50</sub> DO PADRÃO DE LEVODOPA.....	46
GRÁFICO 8	-	CURVA CINÉTICA DA REDUÇÃO DO DPPH DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
GRÁFICO 9	-	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DO RADICAL ABTS REALIZADA COM TROLOX.....	50
GRÁFICO 10	-	COMPORTAMENTO CINÉTICO DA LEVODOPA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO ABTS <sup>•+</sup> .....	50
GRÁFICO 11	-	COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO ÁCIDO DE <i>M. pruriens</i> NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO ABTS <sup>•+</sup> ...	51
GRÁFICO 12	-	COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO ABTS NAS DIFERENTES SUBSTÂNCIAS ANALISADAS.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- Por cento
≤	- Menor ou igual
μg	- Micrograma
μL	- Microlitro
1 BnTIQ	- 1- benzil- 1,2,3,4- tetraidroisoquinolina
1 MeTIQ	- 1- metil – 1,2,3,4 – tetraidroisoquinolina
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
ABTS	- Ácido [2,2'- azino-bis (3- etil- benzolina-6- sulfonado)]
ABTS <sup>•+</sup>	- Radical monocatiônico ABTS <sup>•+</sup>
ARP	- Poder anti-radical
BHA	- Butil-hidroxianisol
BHT	- Butil-hidroxitolueno
Ca <sup>2+</sup>	- Íon cálcio
CDTIQ	- 6, 7-di-hidroxi – 1,2,3,4 – tetraidroisoquinolina
cm	- Centímetro
COMT	- Catecol-O-metil-transferase
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DP	- Doença de Parkinson
DPPH <sup>•</sup>	- Radical (1,1- difenil-2- picril- hidrazil)
EC <sub>50</sub>	- Efficient concentration
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
g	- Grama
g%	- Grama por cento
g/100g	- Grama por cem gramas
g/kg	- Grama por kilograma
GSH - Px	- Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
Kg	- Kilograma
L-Dopa	- Levodopa
M	- Molar
MAO	- Monoamino – oxidase
MCDTIQ	- 1 - metil – carboxi- 6, 7- di-hidroxi- 1,2,3,4 – tetraidroisoquinolina
mg	- Miligrama
mg/kg	- Miligrama por kilograma

mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mM	-	Milimolar
MPTP	-	1-metil- 4- fenil- 1,2,3,6, tetraidropiridina
nm	-	Nanômetro
nM	-	Nanomolar
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
$O_2^{\bullet-}$	-	Ânion superóxido ou radical superóxido
°C	-	Grau Celcius
$OH^{\bullet}$	-	Radical hidroxila
$^{\bullet}OO NO^{\bullet}$	-	Peroxinitrito
rpm	-	Rotação por minuto
SOD	-	Superóxido-dismutase
TEAC	-	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TIQ	-	1,2,3,4 – tetraidroisoquinolina

## RESUMO

A *Mucuna pruriens* é uma planta da família Fabaceae típica de regiões tropicas e atualmente estudada devido à presença de levodopa, substância utilizada para o tratamento da doença de Parkinson (DP). A DP é uma desordem neurológica de causa ainda desconhecida, que acomete principalmente os idosos. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio e os radicais livres podem contribuir para o avanço dessa doença. Alguns estudos, realizados principalmente na Índia, demonstram que a utilização da *M. pruriens* para o tratamento da DP apresenta resposta superior ao tratamento feito com levodopa, por esse motivo e devido ao pequeno número de estudos que contemplam essa planta em nosso país o presente trabalho foi realizado. O extrato da *M. pruriens* foi preparado para que fosse possível analisar a presença de compostos fenólicos; quantificar, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o teor de levodopa; testar o produto em camundongos submetidos aos sintomas de parkinsonismo através da avaliação de sua função motora em campo aberto; e finalmente avaliar a atividade antioxidante do extrato, através de testes colorimétricos, entre os quais o ensaio de redução do complexo de fosfomolibdênio, o ensaio de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup> e o ensaio de redução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Os resultados encontrados demonstraram alta concentração de levodopa no extrato, 0,12g de levodopa por mg de extrato, no entanto, a presença dessa substância não foi suficiente para reverter os sintomas da DP nos animais. Observou-se que camundongos do grupo controle, tratados apenas com salina, apresentaram significativa diferença ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais que receberam com extrato nos parâmetros de locomoção, levantar e imobilidade quando comparados aos grupos tratados com extrato. Os resultados obtidos também demonstraram que a planta possui alta concentração de compostos fenólicos, 6,48g em 100g de semente seca de mucuna, o qual sugeria que o extrato possuía importante atividade antioxidante. Esta atividade foi estudada e os valores apresentados confirmaram esta correlação. O ensaio com fosfomolibdênio mostrou que o extrato possuía atividade inferior à da vitamina C. Entretanto, os ensaios realizados com os radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> apresentaram valores semelhantes aos encontrados em literatura e que evidenciaram importante atividade antioxidante quando comparados aos valores de substâncias comumente utilizadas como padrão para essa avaliação, como o Trolox, a quercitina, o ácido ascórbico e o butil hidróxi touleno (BHT). A avaliação da atividade antioxidante de um padrão de levodopa, no entanto, foi superior por se tratar de um composto fenólico isolado. Dessa forma

pôde-se concluir que apesar da presença de levodopa e da intensa atividade antioxidante, outros fatores ainda não detectados, prejudicaram a avaliação da função motora dos animais e, portanto novos estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar melhor esse resultado.

**Palavras chave:** *Mucuna pruriens*, doença de Parkinson, antioxidante, levodopa, compostos fenólicos

## ABSTRACT

*Mucuna pruriens* (L.) Dc. is a plant of Fabaceae family, typically found at tropical regions and currently studied due the L-Dopa presence, a drug employed to treat the Parkinson disease (PD) treatment. PD is a neurological disorder of unknown cause, affecting mainly the elderly population The disease advance can be launched by the oxygen reactive species (RON). Scientific studies conducted at India showed best results with *M. pruriens* employment, when compared to L-Dopa. Considering these best results and the few studies developed in Brazil, enrolling this plant, the present research was developed. Using the *M. pruriens* extract, the phenolic presence was analyzed; the concentration of L-Dopa in the extract was determined by high performance liquid efficiency (HPLC); it effects on parkinsonism animal model motor function were evaluated and, finally, its antioxidant activity. The results showed a high L-Dopa concentration (0,12g/ mg of extract). Even though, the L-Dopa concentration applied at animal model tests was not enough to revert the parkinsonism symptoms. When compared with the control group, animal does not treat with the extract showed better results for locomotion, uprising and immobility ( $p < 0,05$ ). The high phenolic concentration verified at *M. pruriens* extract (6,48g in 100g of *M. pruriens* dry seeds) suggests the extract would have an important antioxidant activity. The antioxidant activity studies confirmed this correlation. The fosfomolibdenum assay showed minor activity of extract when compared with ascorbic acid. ABTS and DPPH assays showed similar values when compared with the literature. They had evidenced important antioxidant activity to the standard substances used for this evaluation, as Trolox, quercitine, ascorbic acid and BHT. An L-Dopa pattern, an isolated phenolic substance, showed superior antioxidant activity. This study concluded that although the L-Dopa presence and high antioxidant activity, other factors not yet detected, had harmed the evaluation of motor function of mice and, therefore new studies must be lead to better elucidate these results.

**Key words:** *Mucuna pruriens*, antioxidants, Parkinson disease, phenolic compounds; L-Dopa

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Mucuna pruriens* (L.) Dc. é típica de regiões tropicais e conhecida por possuir diversas propriedades medicinais. A semente desta planta possui levodopa (MISRA; WAGNER, 2004), fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Parkinson. A importância do estudo das substâncias presentes na semente de *Mucuna pruriens* está principalmente relacionada às suas possíveis ações sobre o sistema nervoso central (SNC). Estudos recentes têm demonstrado que o tratamento com *M. pruriens* controla os sintomas da doença de Parkinson (MANYAM; DHANASEKARAN; CASSADY, 2005). Foi verificado que, com o emprego da técnica indiana *Ayurveda*, após a administração da mesma concentração de levodopa isolada e com a semente de *Mucuna sp.* pulverizada, a segunda apresenta resposta mais efetiva (NAGASHAYANA et al., 2000). Um estudo desenvolvido nos Estados Unidos mostrou que a administração de 125 ou 250 mg/kg de levodopa sintética em ratos possui efeito inferior ao da administração de cápsulas de 2,5 ou 5,0 g/kg de *M. pruriens* (HUSSIAN; MANYAM, 1997). Essa planta também possui atividade significativamente alta quando comparada com a levodopa em modelo de parkinsonismo em ratos lesados por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (MANYAM; DHANASEKARAN; CASSADY, 2005).

Estudos sugerem que as propriedades antioxidantes de *Mucuna sp.* devem ser urgentemente analisadas, devido aos benefícios que estas podem trazer aos seus consumidores (SIDDHURAJU; BECKER, 2001a). Ensaio clínicos sobre a relação entre diversas doenças degenerativas, que acometem principalmente os idosos, e a efetividade de vários antioxidantes, vêm aumentando uma vez que o cérebro possui uma alta sensibilidade aos danos oxidativos (FLOYD, 1999).

Com todas as propriedades que a *M. pruriens* possui descritas na literatura internacional, torna-se necessário que estudos sejam realizados com plantas cultivadas em território nacional, uma vez que o solo, o clima, a umidade, entre outros, são fatores que interferem diretamente na concentração das substâncias presentes nas plantas medicinais.

Atualmente há uma subutilização dessa espécie no país, uma vez que

essa é utilizada apenas para fixar nitrogênio da atmosfera e fornecer matéria orgânica ao solo.

Com o crescente envelhecimento da população brasileira e conseqüente aumento de doenças crônicas não transmissíveis, a *M. pruriens* poderá ser uma alternativa para o controle de sintomas e tratamento destas doenças, principalmente a doença de Parkinson.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens*

### 2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Determinar o teor de compostos fenólicos no extrato de *Mucuna. pruriens*.

Identificar quali e quantitativamente a presença de levodopa no extrato de *M. pruriens*

Comparar a atividade antioxidante do extrato de *Mucuna pruriens* com a atividade de um padrão comercial de levodopa de alto grau de pureza

Analisar o efeito do extrato de *M. pruriens* na atividade geral de locomoção, movimento de levantar e imobilidade.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Mucuna pruriens* e SUBSTÂNCIAS ASSOCIADAS

A espécie *Mucuna pruriens* (L.) Dc. (Figura 1) é uma planta da família Fabaceae (RAJESHWAR et al., 2005) nativa de regiões tropicais, especialmente, Índia, África e Ilhas do Pacífico (BIOSOURCING..., 2005). É conhecida popularmente como feijão-veludo, mucuna, nescafé, pó-de-mico, fava-coceira, cabeça-de-frade, cowage, vaca-coceira, feijão de Bengal, feijão-de-mauritius, feijão-comichoso, krame, pica-pica, chiporro, feijão-de-búfalo, feijão da Flórida, feijão-cabeludo-da índia, feijão-de-gado e mucuna vilosa (RAINTREE..., 2005).

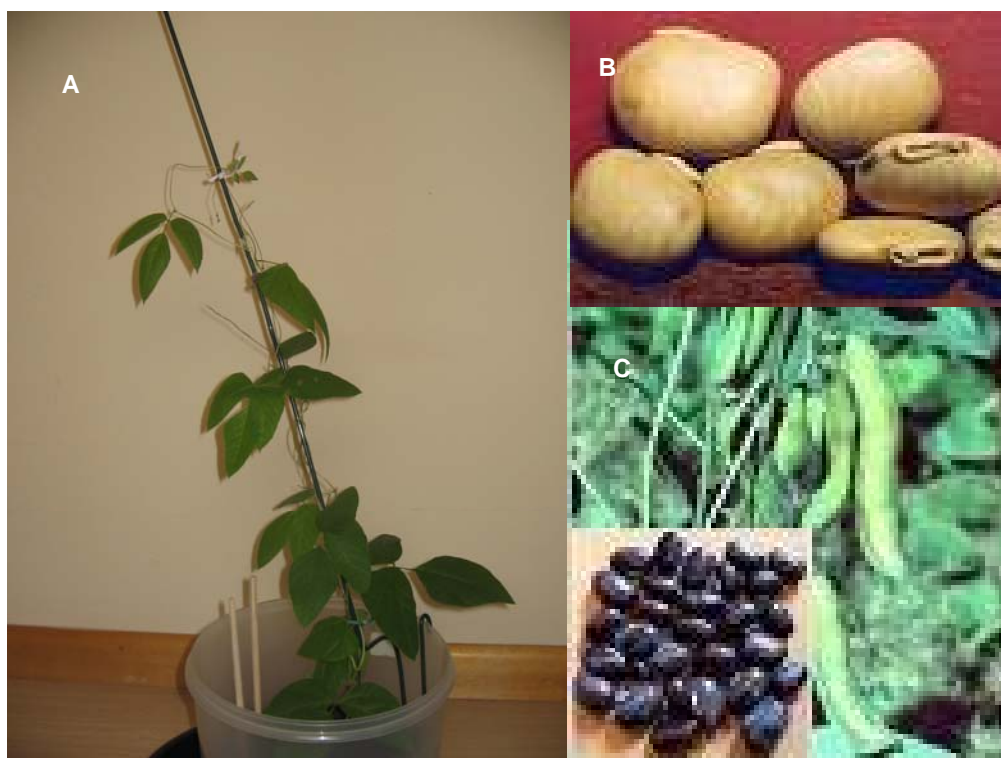


FIGURA 1 - *Mucuna pruriens*: Em A, FOTO DA PLANTA EM CRESCIMENTO; EM B DETALHE DE SEMENTES VERDES DE *Mucuna pruriens* ; EM C, DETALHE DE VAGENS DA PLANTA E DE SEMENTES PRETAS DE *Mucuna pruriens* .

FONTES: O AUTOR; MOTHERHERBS, 2007; HORIZONHERBS, 2007.

Essa planta possui capacidade nutricional comparável à soja, com semelhantes proporções de proteínas, lipídeos, minerais e outros nutrientes. As sementes são utilizadas como alimento em diversos países como Índia, Filipinas, Nigéria, Gana e alguns países da América Latina, no entanto, esta utilização é limitada devido à presença de substâncias como os compostos fenólicos, as lectinas, inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina), fitatos e saponinas, as quais podem interferir na digestão e absorção dos nutrientes (SIDDHURAJU; BECKER, 2005). Devido à presença dessas substâncias, a *M. pruriens* não deve ser consumida sem um prévio tratamento térmico (SIDDHURAJU; BECKER, 2001b). O preparo doméstico não afeta o valor nutricional dessa espécie de feijão, no entanto, devido à desnaturação térmica, reduz as concentrações das substâncias antinutricionais citadas, mantendo-as em valores aceitáveis para o consumo (SIDDHURAJU; BECKER, 2001 b).

O preparo doméstico não afeta o valor nutricional dessa espécie de feijão, no entanto, devido à desnaturação térmica, reduz as concentrações das diversas substâncias antinutricionais, como os compostos fenólicos, inibidores da tripsina e quimotripsinas, fitatos e saponinas, mantendo-os em valores aceitáveis para o consumo (SIDDHURAJU; BECKER, 2001b).

Todas as partes desta planta possuem propriedades medicinais. A designação *pruriens* dada à espécie, é devida ao prurido causado quando se entra em contato com os “pêlos” que a vagem da planta apresenta (RAINTREE..., 2006). Essa sensação se deve à serotonina presente nessas estruturas (SZABO; TEBBETT, 2002). Historicamente, essa planta é utilizada no tratamento de depressão, desordens nervosas e mentais e do aparelho reprodutor, como a infertilidade masculina (TRIPATHI; UPADHYAY, 2002). Possui ação anti-helmíntica, afrodisíaca, adstringente, analgésica e carminativa (RAINTREE..., 2006). Na Índia, é utilizada em um sistema de medicina denominado *Ayurveda*, cuja prática teve início há cerca de 4.500 anos a.C. (MANYAM, 1990).

Em 1937, um grupo de cientistas indianos isolou da semente da mucuna a levodopa (L-Dopa) (MANYAM, 1990), fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Parkinson, e desde então, a demanda por essa planta

vem crescendo continuamente. Atualmente, sabe-se que o maior constituinte fenólico das sementes da mucuna é a levodopa (aproximadamente 5%) (DAXENBICHLER et al., 1971). Em menor quantidade, aproximadamente 0,25%, encontram-se as tetraidroisoquinolinas metiladas, como a 1-metil -3 carboxi-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (MCDTIQ), ou não metiladas, como a 6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (CDTIQ) (MANYAM, 1990; SIDDHURAJU; BECKER, 2001b) (Figura 2). Estas substâncias estão presentes nas raízes, caules, folhas e sementes (SZABO; TEBBETT, 2002).

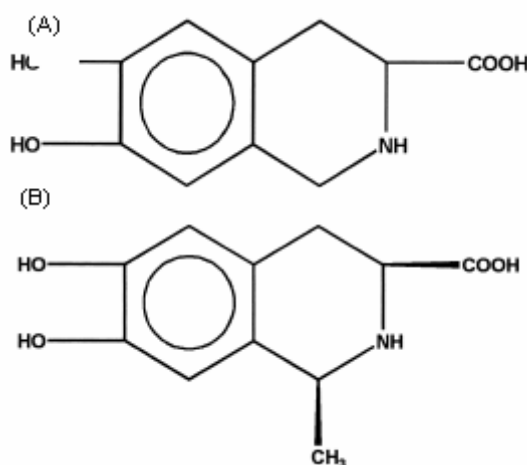


FIGURA 2: ESTRUTURAS QUÍMICAS: (A) L - 3 - CARBOXI - 6, 7 - DIIDROXI - 1, 2, 3, 4 - TETRAIDROISOQUINOLINA (CDTIQ); (B) A 1-METIL - 3 - CARBOXI - 6, 7 - DIIDROX - 1, 2, 3, 4 - TETRAIDROISOQUINOLINA (MCDTIQ)

FONTE: SIDDHURAJU; BECKER ( 2001b)

Tanto a levodopa, como as tetraidroisoquinolinas, metiladas ou não, oxidam-se facilmente em pH alcalino, altas temperaturas (70-100°C), ou em presença de umidade ou água, formando compostos coloridos escuros (SIDDHURAJU; BECKER, 2001b).

Diversas 1,2,3,4 - tetraidroisoquinolinas (TIQ) também estão presentes no cérebro, algumas são endógenas enquanto outras não são sintetizadas, mas sempre estão presentes no tecido cerebral (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al.,

2001). As TIQs não sintetizadas estão presentes em certos gêneros alimentícios e atravessam a barreira hematoencefálica (FELIPPE JÚNIOR, 2004). Estudos demonstram que quando administradas cronicamente em ratos, as TIQs produzem degeneração dos neurônios dopaminérgicos, no entanto, nem todas as são igualmente tóxicas. Enquanto as N-metil derivadas parecem ser neurotóxicas, as 1-metil derivadas parecem possuir atividade neuroprotetora (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2001). Pesquisadores verificaram que entre os derivados endógenos, a 1 –metil -1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (1MeTIQ) possui atividade neuroprotetora, enquanto que a 1-benzil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (1BnTIQ) possui propriedades neurotóxicas, apresentando-se com níveis elevados em pacientes com a doença de Parkinson, além de produzir tremores e rigidez quando administrada intraperitonealmente em macacos e ratos e possuir atividade antidopaminérgica. Verificou-se também que as propriedades pró-parkinsonismo da 1BnTIQ eram prevenidas pela 1MeTIQ (YAMAKAWA et al., 1999; ANTKIEWICZ-MICKALUK et al. 2001). Assim, pacientes portadores da doença de Parkinson tendem a ter um aumento de 1BnTIQ no fluido cérebro-espinhal, enquanto que a 1MeTIQ tende estar reduzida (YAMAKAWA et al., 1999).

Outras substâncias estão presentes nas diversas partes da *M. pruriens*, entre elas, é possível citar a nicotina, a fisostigmina, a serotonina (DUKE, 1981), a bufotenina, a colina, a N, N - dimetil - triptamina e alguns compostos indólicos (GHOSAL et al. 1971)

A fisostigmina é um composto anticolinérgico cuja administração resulta em acúmulo e exacerbação dos efeitos da acetilcolina, levando à estimulação do trato gastrintestinal, miose e contração dos músculos liso e esquelético. A intoxicação por este fármaco pode levar à confusão, ataxia, dificuldade na fala e em casos extremos, convulsão, coma e morte por depressão respiratória (SZABO; TEBBETT, 2002).

As triptaminas, bufoteninas e N,N-dimetiltriptamina são compostos que estão relacionados à serotonina e possuem potentes efeitos sobre o cérebro, podendo causar alucinações. A serotonina, encontrada especialmente nas vagens e folhas, é um neurotransmissor que possui diversos efeitos sobre os

nervos, músculo liso, trato gastrintestinal e sistemas respiratório e cardiovascular e quando em contato com a pele, causa sensação de queimação intensa, inflamação, ardência e coceira (SZABO; TEBBETT, 2002).

A nicotina, também presente na mucuna, é uma substância extremamente tóxica, cujas doses de 40 a 60 mg são suficientes para matar um ser humano. É absorvida no trato gastrintestinal, pelos pulmões e através da pele (SZABO; TEBBETT, 2002).

## 3.2. ESTRESSE OXIDATIVO

### 3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

Radical livre pode ser definido como qualquer espécie química capaz de existência independente por conter um ou mais elétrons não pareados. Varia em relação a sua reatividade química, podendo apresentar-se na forma de átomo ou molécula (ROCCO, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais livres formados durante o metabolismo celular (VALKO et. al, 2006). Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante dentre os radicais livres formados em organismos vivos (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). Assim, as EROs podem ser definidas como qualquer molécula que contém oxigênio capaz de gerar radicais ou espécies químicas cujo último orbital quântico possua um elétron desemparelhado (PELEGRINI, 2005). A Tabela 1 apresenta as principais espécies reativas de oxigênio.

Entre os mecanismos biológicos, para os quais os processos oxidativos são importantes, destacam-se a apoptose, a fagocitose, a quimiotaxia das células do sistema imune e a sinalização para a formação dos trombos no processo de coagulação sanguínea (JACOB; BURRI, 1996). Entretanto, o uso de medicamentos, o tabagismo, as condições nutricionais, o consumo de álcool, a poluição (MACHLIN, 1992) podem aumentar o número de radicais livres no

organismo, levando a um desequilíbrio entre essas substâncias (EUROFEDA, 2005).

A grande quantidade de radicais livres pode danificar o DNA e está bastante associada às alterações que acompanham o envelhecimento, como por exemplo, as diversas degenerações que ocorrem com o passar do tempo, levando ao câncer e a doenças do coração (GOH; BARLOW; YOUNG, 2003; EUROFEDA, 2005).

TABELA 1: ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
$HO_2^{\cdot}$	Radical perhidroxil
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila
$RO^{\cdot}$	Radical alcóxil
$ROO^{\cdot}$	Radical peróxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico (ex.: lipoperóxido)
$^1O_2$	Oxigênio singlet
$RO^{\cdot}$	Carbonila excitada

FONTE: SIES, 1991.

As EROs podem causar dano oxidativo em várias macromoléculas biológicas. Os danos oxidativos ao DNA podem ocorrer sob condições metabólicas normais e algumas são conhecidas por serem mutagênicas, no entanto, existem enzimas específicas, capazes de reparar o DNA e, por conseguinte, remover esses danos. Contudo, os sistemas de reparo não são perfeitos e ainda que removam 99% das lesões, a porcentagem remanescente pode elevar-se ao longo do tempo e acumular-se (FREI, 1994).

No sistema biológico, o processo de oxidação é induzido pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os quais são formados como produtos de diversas reações bioquímicas e também pela cadeia transportadora de elétrons (TRIPATHI; UPADHYAY, 2002; EUROFEDA, 2005). Normalmente, uma fração de cerca de 95% do oxigênio é metabolizada até água via cadeia de elétrons, os

outros 5% formam os radicais livres (PÓVOA-FILHO, 1995). Os radicais livres são formados durante a entrada normal do oxigênio em uma infecção ou no metabolismo oxidativo normal de certos substratos. Durante a respiração aeróbica normal, a mitocôndria processa as moléculas de oxigênio, reduzindo-as à água. Nesse processo ocorre a produção de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (PRASAD; COLE; KUMAR, 1999). No entanto, como normalmente a mitocôndria não permite o extravasamento dos radicais livres, os radicais nela formados não representam um grande risco a não ser que haja uma destruição ou isquemia dessa organela celular (PÓVOA; PÓVOA-FILHO, 1995; PRASAD; COLE; KUMAR, 1999).

Em uma infecção viral ou bacteriana, as células fagocíticas geram altos níveis de óxido nítrico (NO),  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  para destruir os agentes infectantes, no entanto, esses radicais podem danificar também as células normais (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993).

Na degradação de ácidos graxos e outras moléculas por peroxissomos, ocorre a produção de  $H_2O_2$  (PRASAD; COLE; KUMAR, 1999). Algumas enzimas cerebrais como a monoamino-oxidase (MAO), tirosina-hidroxilase e L-aminoácido-oxidase produzem  $H_2O_2$  como subproduto de suas atividades (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993). A oxidação do ascorbato e das catecolaminas também gera  $H_2O_2$  (CHAN; FISHMAN, 1980). O estresse oxidativo também pode gerar íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) mediado pela ativação dos receptores de glutamato (PRASAD; COLE; KUMAR, 1999). A ativação  $Ca^{2+}$ -dependente da fosfolipase  $A_2$  pelo N-metil-D-aspartato (NMDA) libera ácido aracdônico, que por sua vez, libera  $O_2^{\bullet-}$  durante a biossíntese dos ecosanóides (CHAN; FISHMAN, 1980). O NO formado pela óxido-nítrico-sintase, estimulada pelo  $Ca^{2+}$ , pode reagir com o  $O_2^{\bullet-}$  para formar ânions de peroxinitrito que podem formar  $OH^{\bullet}$  (BECKMAN et al., 1990).

Algumas enzimas como a xantina-oxidase e a flavoproteína-oxidase também podem formar ânions superóxidos durante o metabolismo de seus respectivos substratos (PRASAD; COLE; KUMAR, 1999)

Agentes externos podem aumentar o estresse oxidativo, entre eles estão:

o uso abusivo de drogas e produtos químicos e os poluentes do ar (PÓVOA; PÓVOA-FILHO, 1995). O fumo eleva o nível de NO (KIYOSAWA, 1990) e diminui os níveis de antioxidantes (DUTHIE; ARTHUR; JAMES, 1991). Tanto o ferro como o cobre livres, podem aumentar os níveis de radicais livres (WINTERBOURN, 1995). Diversos alimentos possuem compostos fenólicos que ao serem oxidados formam radicais livres (GOLD et al., 1992).

Atualmente, mais de 45 doenças são conhecidas por serem mediadas por radicais livres (TRIPATHI; UPADHYAY, 2002). Recentemente, diversos estudos clínicos sobre doenças neurodegenerativas vêm aumentando o alvo de sua avaliação sobre a atividade de vários antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio e os danos oxidativos são importantes fatores envolvidos nesse processo, onde o envelhecimento apresenta-se como um dos riscos mais significativos para as desordens neurológicas degenerativas (FLOYD, 1999).

Durante a formação de radicais livres, o  $O_2^{\bullet}$  forma-se primeiro e pode ser espontaneamente dismutado, formando o  $H_2O_2$ , ou então cataliticamente, através de uma enzima superóxido-dismutase (SOD), conforme apresentado na Figura 3. As duas principais SODs no organismo são a CuZn-SOD, presente no citoplasma e a Mn-SOD, presente na mitocôndria (PÓVOA; PÓVOA-FILHO, 1995). O  $O_2^{\bullet}$  é fracamente reativo, mas pode converter-se em espécies mais reativas devido à possibilidade de dois radicais superóxidos combinarem-se com o  $H_2O_2$ , gerando o radical  $OH^{\bullet}$  (ANDERSON; PHILLIP, 1999)

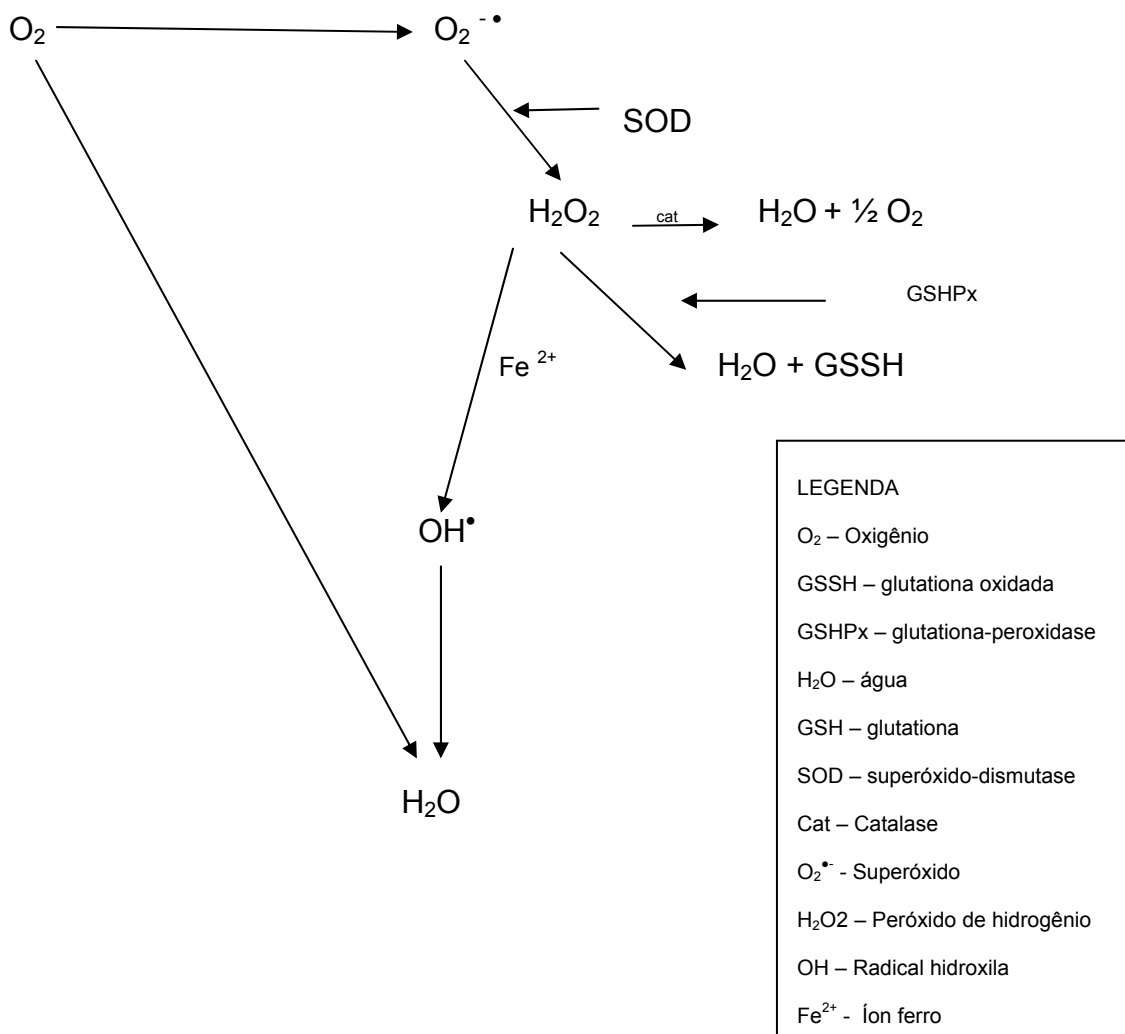
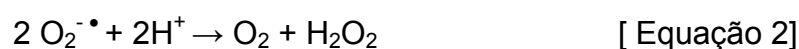
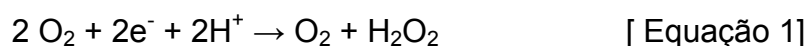


FIGURA 3: FORMAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES

FONTE: PÓVOA; PÓVOA-FILHO (1995)

O  $H_2O_2$  não é um radical livre, mas é um potente formador destes. Em presença de metais de transição, forma a mais deletéria ERO, o radical  $OH^{\bullet}$  (PÓVOA; PÓVOA-FILHO, 1995). O  $H_2O_2$  pode ser formado pela redução bivalente do oxigênio (Equação 1) ou pela reação de duas moléculas (Equação 2), ocorrendo espontaneamente ou sendo catalisada pela SOD (SALTMAN, 1989).



O  $OH^{\bullet}$  é altamente reativo e pode reagir com moléculas capazes de doar um elétron a compostos como enzimas, açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos

ou fosfolipídios de membrana (JAY; BERTHON, 1998). Como não há enzimas que o metabolizem, provoca extenso perecimento tissular (PÓVOA; PÓVOA-FILHO, 1995), possuindo potencial destrutivo e mutagênico (JAY; BERTHON, 1998).

O NO<sup>•</sup> é um radical livre que apresenta potente ação vasodilatadora e parece desempenhar importante função nos tecidos nervosos. Possui inúmeras funções de relevância, tais como relaxamento vascular, atividade neuronal e diminuição da agregação plaquetária, assim como diversos efeitos deletérios como choque endotóxico, carcinogênese e está presente nos processos inflamatórios. Suas fontes são o endotélio vascular, os neurônios, as plaquetas, os macrófagos, os neutrófilos, as células de Kupffer e os hepatócitos (PÓVOA e PÓVOA-FILHO, 1995).

No sistema nervoso central há fixação de glutamato nos receptores NMDA, provocando penetração de Ca<sup>2+</sup> que ativará a enzima óxido nítrico sintase (NOS) com formação de NO<sup>•</sup> a partir da arginina. No sistema imune, as citocinas, toxinas de *E. coli* etc, provocam a formação no macrófago de NO<sup>•</sup> por um mecanismo semelhante; o NO<sup>•</sup> combina-se com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> formando peroxinitrito (OO NO<sup>•</sup>) (PÓVOA-FILHO, 1995)

O cérebro é extremamente sensível aos radicais livres. A abundância de ácidos graxos polinsaturados facilita os processos pró-oxidantes (PÓVOA-FILHO, 1995), uma vez que a peroxidação desses ácidos destrói a função normal da membrana e dos receptores celulares, tendo como consequência a desnaturação de proteínas, levando à desativação de enzimas e danos às pontes de ligação do DNA (ROGERS et al; 2000). Outros fatores coadjuvantes são o elevado teor de ferro, baixo teor de quelantes deste e escassez de antioxidantes nessa região (PÓVOA-FILHO, 1995).

### 3.2.2. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que previnem ou diminuem o desarranjo de outras substâncias pelo oxigênio (EUROFEDA, 2005). Podem agir bloqueando a formação de radicais livres ou interagindo com estes, inativando-os, portanto, podem ser definidos como qualquer substância capaz de doar elétrons para um radical livre, tornando-o um composto eletricamente estável (OLIVEIRA, 1999). Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem o sistema biológico contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (MONTEIRO, 2006).

Existem dois grupos de antioxidantes endógenos: os antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não-enzimáticos (UFRGS, 2007).

Os antioxidantes enzimáticos são a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio ou os radicais livres. Incluem substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, retardam ou inibem a oxidação de substratos oxidáveis e podem agir em diferentes níveis da cadeia oxidativa (UFRGS, 2007). As principais enzimas antioxidantes são as superóxido dismutases, as catalases e a glutathiona peroxidase (GSH-Px). As SOD localizam-se no citosol (Cu-Zn SOD) e na mitocôndria (Mn SOD) e catalisam a conversão do  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O_2$ ; as catalases encontram-se predominantemente nos peroxissomos e catalisam a conversão de  $H_2O_2$  em água e a GSH-Px encontra-se no citosol, mitocôndria e no meio extracelular e tem a função de converter o  $H_2O_2$  em água e hidroperóxidos em álcoois estáveis (OLIVEIRA, 1999; UFRGS, 2007)

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos sintetizados pelo organismo como a glutathiona, a bilirrubina, a ceruloplasmina, a melatonina, o ácido úrico, ou aqueles ingeridos através da dieta regular como o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol, o selênio, o cobre, o zinco, o beta-caroteno e os flavonóides (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004)

Os antioxidantes exógenos são provenientes da natureza através da dieta

ou elaborados sinteticamente (OLIVEIRA, 1999). As plantas possuem excelentes propriedades antioxidantes e esses efeitos podem ser atribuídos, entre outros, aos seus componentes fenólicos (SOONG; BARLOW, 2004).

Alguns antioxidantes sintéticos podem apresentar toxicidade e requerem altos custos para sua manufatura, mas mostram baixa eficiência quando comparados aos antioxidantes naturais (SOONG; BARLOW, 2004).

#### 3.2.2.1. Compostos fenólicos

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos (DECKER, 1997). Os compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila (ANJO, 2004).

As atividades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à capacidade de seqüestrar os radicais livres (DECKER, 1997). Essas substâncias podem inibir o processo de oxidação em determinados sistemas, mas isto não significa que possam proteger as células de todos os tipos de danos oxidativos. Em determinadas condições, esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante (DECKER, 1997). Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Nos feijões comuns, o conteúdo de polifenóis varia de acordo com a coloração da casca. Segundo BRESSANI (1993), os feijões comuns vermelhos, marrons, pretos e brancos apresentam, respectivamente, o teor médio de 12,6; 7,8; 6,6 e 2,3 mg/g (expresso em catequina). ELIAS, FERNANDEZ e BRESSANI (1979) trabalharam com amostra de feijão comum e encontraram, em ácido tânico/g de amostra, o teor de 3,8 e 3,9 para duas amostras de feijão branco, 9,3 para uma amostra de feijão vermelho e 9,2 e 6,7 para amostras de feijões pretos.

Segundo ADEBOWALE, ADEYEMI e OSHODI (2005), a concentração de fenóis em diferentes espécies de mucuna varia de 4,34% a 7,75%, e a espécie

*Mucuna pruriens* possui um teor de  $7,75 \pm 0,02$  gramas por 100g de sementes secas.

### 3.2.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

Existem diversos métodos para a avaliação da atividade antioxidante. Entre as várias técnicas *in vitro* empregadas, destacam-se aquelas que consistem em determinar a atividade antioxidante frente a substâncias cromógenas de natureza radical. A perda da cor ocorre de forma proporcional à concentração da substância que possui essa atividade (KUSKOSKI et al., 2005).

Diferentes métodos são utilizados para a avaliação da resistência das substâncias à ação de antioxidantes potenciais. A maioria dos testes é realizada diminuindo o período da cadeia transportadora de elétrons, usando altas temperaturas ou aumentando a oferta de oxigênio (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Esses testes podem ser realizados em substâncias isoladas ou em extratos, e podem ser testados *in vivo* ou *in vitro* (SILVA, 2003). Os métodos *in vitro* mais comuns para determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são aqueles envolvendo um radical cromóforo que simulam as espécies reativas de oxigênio. A presença de antioxidantes leva ao desaparecimento da cor desses radicais, sendo os mais utilizados o ABTS<sup>•+</sup> e o DPPH<sup>•</sup> (ARNAO, 2000). Os métodos *in vitro* podem ser considerados como avaliações potenciais, uma vez que a interação fisiológica entre o organismo e a substância avaliada não é analisada (SILVA, 2003).

A atividade antioxidante *in vivo* é determinada por vários fatores, tais como sua atividade frente ao radical, o número de radicais que consegue seqüestrar, a destruição do radical pelo antioxidante, a concentração e a mobilidade, a interação com outros antioxidantes e o sítio de geração e a reatividade do radical (NIKKI, 2002).

Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois vários mecanismos antioxidantes podem ocorrer (OU et al., 2002).

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante apresentam dificuldade em serem comparados devido à sua complexidade e diferentes princípios das reações. Alguns chegam a reproduzir resultados diferentes e até mesmo contraditórios o que impossibilita esse tipo de comparação (ALONSO et al., 2002).

#### 3.2.3.1. Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio

Outro método freqüentemente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio. Segundo PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999), o método de complexação pelo fosfomolibdênio para determinação da capacidade antioxidante total é baseado na redução do molibdênio VI a molibdênio V pela amostra analisada e subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio V em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695nm.

A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde a medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz.

#### 3.2.3.2. Ensaio da redução do radical livre DPPH

Dentre os métodos químicos utilizados para a determinação da atividade antioxidante, destaca-se o método que utiliza o DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, dessa forma, é reduzido na presença de um antioxidante. O ensaio de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup> tem sido amplamente utilizado como um método químico para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, especialmente para extratos de plantas medicinais (BRACA et al., 2002) e vegetais comestíveis (LLORACH et al., 2003).

Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a

515nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. Essa mudança é acompanhada pela mudança de coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH residual corresponde inversamente à atividade antioxidante da substância analisada.

### 3.2.3.3 Ensaio de redução do radical ABTS

O radical monocatiônico ABTS<sup>•+</sup> é gerado pela oxidação do ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil-benzolona-6-sulfonato)] com persulfato de potássio e é reduzido na presença de um hidrogênio doador de elétrons. Esse teste pode ser utilizado tanto para substâncias lipofílicas, quanto para substâncias hidrofílicas, incluindo flavonóides, carotenóides e antioxidantes plasmáticos. Essa metodologia avalia a atividade antioxidante total de substâncias e compostos puros e extratos (RE, 1999). Assim, ocorre a formação de um radical cromóforo (ABTS<sup>•+</sup>), onde a atividade oxidante é avaliada pela supressão da cor quando substâncias antioxidantes são adicionadas ao meio (SILVA, 2003).

## 3.3 A DOENÇA DE PARKINSON E SEU TRATAMENTO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurológica degenerativa progressiva do sistema nervoso central que acomete principalmente o sistema motor. O parkinsonismo é uma síndrome clínica caracterizada por expressão facial diminuída, postura curvada, lentidão da movimentação voluntária, marcha festinante, rigidez e tremor ondulante (GIROLAMI, 1996). Os principais sintomas são bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso e deficiência do equilíbrio postural (STANDAERT; YOUNG, 1996). Essa síndrome pode ser induzida por drogas que afetem esse sistema, principalmente os antagonistas da dopamina, a reserpina e toxinas como o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina)

(GIROLAMI, 1996)

Com o aumento da expectativa média de vida da população mundial, a doença de Parkinson e outros problemas neurodegenerativos estão próximos de superar o câncer como a principal causa de morte nas populações adulta e idosa (FORMAN; TROJANOVSKI; LEE, 2004). Essa doença surge em um período mais avançado da vida e é notada com frequência crescente em indivíduos idosos. Esse tipo de distúrbio motor é observado em inúmeras condições que têm em comum o comprometimento do sistema dopaminérgico nigroestriado (GIROLAMI, 1996). É resultante da extensa destruição de uma porção da substância negra, a parte compacta, que envia fibras nervosas secretoras de dopamina para o núcleo caudado e putâmen (GUYTON; HALL, 1997). A Figura 4 indica a região do cérebro atingida pela doença de Parkinson.

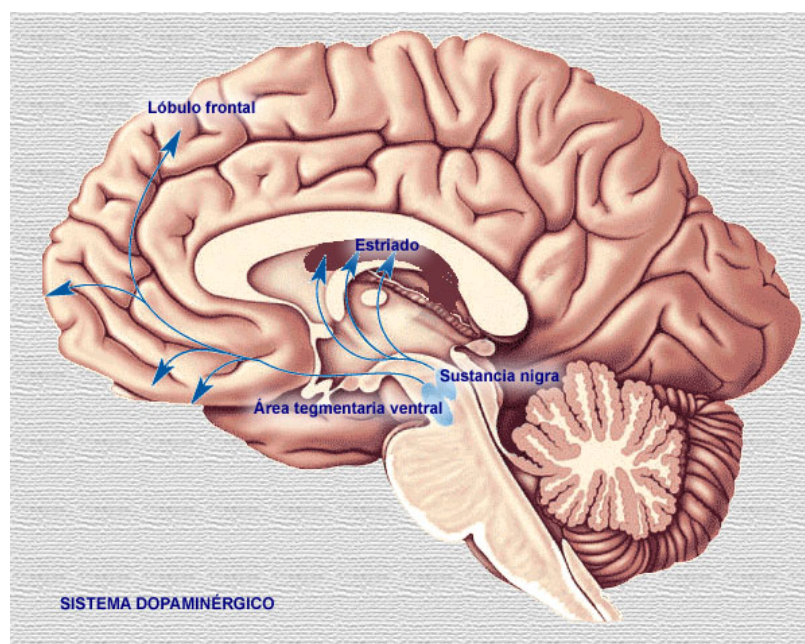


FIGURA 4: SISTEMA DOPAMINÉRGICO

FONTE: ATLAS DE NEUROLOGIA, 2007

As causas dessa degeneração ainda não são bem compreendidas, entretanto, pode-se associar a interação entre diversos fatores, entre eles, toxinas externas, presentes no ambiente e na dieta; toxinas internas, oriundas do metabolismo normal; fatores genéticos (PRASAD; COLE; KUMAR, 1999) e em

geral aceita-se que a formação de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio possui um importante papel na patogênese neurodegenerativa e na progressão da doença de Parkinson (METODIEVA; KOSKA, 2000; FOLEY; RIEDERER, 2000).

Os neurônios dopaminérgicos da substância negra projetam-se para o núcleo estriado, e suas degenerações na DP estão associadas a uma redução no conteúdo estriado de dopamina. A gravidade da síndrome motora é proporcional à deficiência dessa substância (GIROLAMI, 1996).

### 3.3.1 O Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson

Até o presente momento não é possível curar, estacionar ou prevenir a doença de Parkinson. As abordagens terapêuticas existentes visam diminuir os sintomas da doença. Os principais tratamentos utilizados atualmente são: a terapia farmacológica e a cirúrgica, sendo esta empregada como última alternativa.

Os tratamentos de primeira linha são realizados com a levodopa, que será discutida no item 3.3.1.1 para melhor elucidação de sua ação; a bromocriptina, lissurida, pergolida e paramipexol que são agentes agonistas de receptores de dopamina (D-2), portanto dopaminomiméticos, e podem ser associados com a levodopa (BRAVO; NASSIF, 2006).

O tratamento de segunda linha é realizado com a utilização de anticolinérgicos centrais como o biperideno, o metixeno e o triexifenidil, que exercem seus efeitos bloqueando a transmissão colinérgica central da acetilcolina (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2002).

O tratamento de terceira linha pode ser realizado com inibidores da catecol-O-metil-transferase (COMT) como a benserazida, entacapona e talcapona. São eficazes somente quando administrados em conjunto com a levodopa, pois catalisam a metilação da levodopa a 3 metildopa (KAAKKOLA; GORDIN; MANNISTO, 1994).

A selegilina atua retardando a degradação da dopamina, por inibição irreversível da enzima MAO tipo B e também desaminando oxidativamente a dopamina no cérebro. Inibe a recaptação da dopamina a partir do espaço sináptico e pode ser prescrita isoladamente ou em associação com a levodopa (OERTEL; QUINN, 1996). Amantadina que é um agente antiviral, cujo mecanismo ainda não é bem elucidado, mas provavelmente aumente a liberação da dopamina das extremidades nervosas e também inibe a recaptação da dopamina, pode ser utilizada isolada ou em associação com levodopa ou agentes anticolinérgicos (BAILEY; STONE, 1975)

### 3.3.1.1 O tratamento com levodopa

O uso da levodopa (Figura 5) geralmente melhora os sintomas dessa doença. Acredita-se que a razão disso seja porque a levodopa é convertida no cérebro em dopamina, por ação da enzima dopa-descarboxilase (PARKINSONONLINE, 2006), restaurando o equilíbrio entre a inibição e a excitação no núcleo caudado no putâmen. A administração da própria dopamina (Figura 5) não possui o mesmo efeito, pois, esta possui uma estrutura química que não lhe permite atravessar a barreira hematoencefálica como faz a levodopa (GUYTON; HALL, 1997).

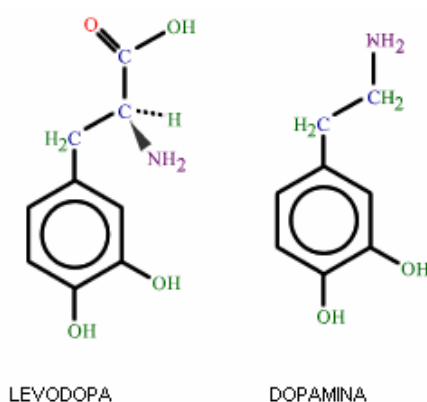


FIGURA 5. FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA LEVODOPA E DA DOPAMINA  
FONTE: GREENER-INDUSTRY (2007)

A levodopa é rapidamente absorvida na porção proximal do intestino delgado através de um transporte ativo de aminoácidos aromáticos. A taxa de absorção da levodopa e sua biodisponibilidade dependem da velocidade do esvaziamento gástrico, do pH do suco estomacal e do período de tempo que a droga fica exposta a enzimas de degradação da mucosa gástrica e intestinal (STANDAERT; YOUNG, 1996). Alguns fatores como a presença de aminoácidos, principalmente a fenilalanina e a leucina; a redução da motilidade do estômago e a ingestão de alimentos ricos em proteínas, próximo do horário da tomada da medicação, podem retardar ou mesmo reduzir a absorção dessa droga. Grande parte da levodopa administrada isoladamente é metabolizada em dopamina antes de atingir o cérebro, por ação da dopa-decarboxilase (SZABO; TEBBETT, 2002; PARKINSONONLINE, 2006), enzimas da mucosa intestinal e de outros locais periféricos que são ricos em MAO, de maneira que uma quantidade relativamente pequena da droga inalterada atinge a circulação cerebral e provavelmente menos de 1% penetra no SNC (STANDAERT; YOUNG, 1996) e é convertida em dopamina no gânglio basal. O pico plasmático ocorre de uma a três horas após sua administração (SZABO; TEBBETT, 2002). Além de dopamina, a levodopa periférica também será metabolizada a melanina, norepinefrina, 3-metoxitiramina, metildopa, ácido 3,4-diidrofenilacético e ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético. Esses metabólitos são rapidamente excretados na urina com aproximadamente 80% da dose administrada em menos de 24 horas e menos de 1% é excretada de forma inalterada (SZABO; TEBBETT, 2002).

Normalmente, para o tratamento da doença de Parkinson, a levodopa é prescrita associada a um inibidor da descarboxilase periférica, sendo as mais usuais a carbidopa e a benserazida. Desta forma, ocorre a prevenção da degradação de levodopa pela enzima dopa-descarboxilase (STANDAERT; YOUNG, 1996; SZABO; TEBBETT, 2002) no começo da mucosa intestinal, onde inicia o seu metabolismo. A presença desses inibidores possibilita a disponibilidade da levodopa para o cérebro em 75 - 80%, para que esta tenha o efeito terapêutico desejável (SZABO; TEBBETT, 2002). Além disso, a dopamina liberada na circulação pela conversão periférica da levodopa causa efeitos indesejados, principalmente náuseas (STANDAERT; YOUNG, 1996). Por esses

motivos, quando a levodopa é administrada em conjunto com uma substância que inibe a dopa-descarboxilase, ocorre a inibição da descarboxilase periférica, o que aumenta muito a fração da levodopa administrada e não metabolizada, disponível para atravessar a barreira hematoencefálica, diminuindo assim a incidência de efeitos colaterais digestivos (STANDAERT; YOUNG, 1996).

A entrada da levodopa no SNC através da barreira hematoencefálica é um processo ativo, mediado por um transportador de aminoácidos aromáticos e pode ocorrer competição entre a proteína da dieta e a levodopa a este nível. No cérebro, a levodopa é convertida em dopamina por descarboxilação, principalmente no interior das terminações pré-sinápticas de neurônios dopaminérgicos no estriado (STANDAERT; YOUNG, 1996). A dopamina produzida é responsável pela eficácia terapêutica do fármaco na doença de Parkinson; após sua liberação, é transportada de volta aos terminais dopaminérgicos pelo mecanismo de captação pré-sináptica ou é metabolizada pelas ações da MAO e da COMT (MOURADIAN; CHASE, 1994).

O tratamento da doença de Parkinson inicia-se com uma dose de 0,25 g de levodopa até 1-3 g/dia quando utilizado um inibidor e 8 ou mais g/dia, na ausência deste (STANDAERT; YOUNG, 1996).

Avaliando os trabalhos supracitados, pode-se perceber que além de minimizar os sintomas da doença de Parkinson, outros benefícios podem ser fornecidos aos pacientes portadores desta doença. Entre eles, o aumento da concentração de substâncias antioxidantes no organismo, como certos compostos fenólicos, que propiciam a diminuição dos danos causados pelos radicais livres.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

Sementes pretas e cinzas de *Mucuna pruriens*, pulverizadas, fornecidas pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) – Londrina (PR) e processadas pela indústria Steviafarma - Maringá (PR).

Camundongos Swiss, machos, com peso entre 35 e 50 g, procedentes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

### 4.2. FASES DA PESQUISA

#### 4.2.1. Preparo dos Extratos

Para o preparo dos extratos de *M. pruriens*, diferentes metodologias foram testadas para a obtenção de um produto de fácil solubilidade em água, sem substâncias que interferissem na atividade antioxidante ou no comportamento dos animais analisados e com considerável concentração de levodopa.

Baseando-se nas patentes estabelecidas por DOW (1966) e MANYAM; DHANASEKARAN e HARE (2004), dois diferentes extratos foram preparados: o extrato ácido de *M. pruriens* e o extrato de etanólico *M. pruriens*.

#### 4.2.1.1. Extrato de etanólico de *Mucuna pruriens*.

Esse extrato foi elaborado conforme descrito na patente “Extract of *Mucuna species* and the use thereof as anti parkinson’s disease pharmaceutical” (MANYAM; DHANASEKARAN; HARE, 2004).

Cem (100)g da semente cinza de *M. pruriens* em pó foram percolados por dois dias com hexano para retirada de gordura.

Três extrações foram realizadas:

Para a primeira extração, foram adicionados ao pó 200 mL de álcool etílico a 95% e deixado em banho-maria com agitação por 48 horas. Após este período,

essa suspensão foi centrifugada em Ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Avanti Centrifuge, rotor J25, duas vezes por 10 minutos, 10.000 rpm a 20°C.

Para a segunda extração, o mesmo processo foi realizado.

Para a terceira extração, conforme descrito na patente, houve a redução do volume de etanol. Cento e quarenta mililitros de álcool etílico a 95% foram adicionados à mucuna em pó e os demais procedimentos foram realizados conforme as extrações anteriores.

Os produtos das três extrações foram reunidos e filtrados em kitasato e então concentradas em rota-vapor, sob pressão reduzida à temperatura de 45 a 50°C. Após essa concentração, o extrato foi congelado.

A esse extrato, foi adicionado uma solução 1:1 de água quente e hexano (180 mL de cada) e esta foi agitada até que todo o extrato estivesse diluído. Essa mistura foi colocada novamente em rota-vapor para nova concentração. O produto resultante foi armazenado a – 18°C.

#### 4.2.1.2. Extrato ácido de *Mucuna pruriens*

Para esta extração, foi utilizada a patente estabelecida por DOW (1966), com modificações.

Foram realizadas quatro extrações com 200 g da semente preta de *M. pruriens* pulverizada. Para cada extração, foram acrescentados 600mL de água destilada e nitrogenada e então homogeneizada. Aos poucos foi adicionado ácido cítrico, para que o meio ficasse com o pH entre 3,0 e 4,0. Essa medida foi realizada em pHmetro digital PG200, Gehaka em temperatura média de 23°C e slop 90%.

Após homogeneizada, esta mistura foi filtrada em filtro de tecido sintético de poliéster. O líquido filtrado foi submetido a posterior filtração em kitasato, a vácuo e com duplo papel de filtro Inlab tipo 50.

Para cada nova extração, após a incorporação do pó à água, a mistura era colocada em ultra-som por 10 minutos. Após a 4ª extração todos os filtrados foram reunidos e filtrados novamente em papel Whatman, 125 mm de diâmetro, número 42, para que fosse retirado o pó mais fino que ainda restava na solução.

O extrato foi congelado a -18°C e posteriormente liofilizado em liofilizador

Liobras, modelo L 101.

#### 4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos foram preparados conforme as técnicas anteriormente descritas e a concentração de levodopa foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian® bomba quaternária modelo 9012Q equipado com detector ultravioleta fotodiodo modelo 9065 e injetor automático modelo AI 200. A análise foi promovida em uma coluna de fase reversa C-18 (Varian, 5 µm) em temperatura ambiente, utilizando como fase móvel metanol – água na proporção 20 : 80 (v/v) respectivamente, volume de injeção 20 µL, detecção a 282 nm e corrida cromatográfica de 5 minutos. Essa metodologia foi estabelecida por PEREZ, 2005 <sup>1</sup>.

Para sua análise, o extrato foi diluído em água bidestilada, numa concentração de 0,004 g/mL e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos.

#### 4.2.3 Avaliação da Ação de *Mucuna pruriens* em um Modelo Animal de Parkinsonismo

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA e aprovado. Protocolo número 1444 (ANEXO I).

Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), em um ciclo de claro-escuro de 12 horas (7:00-19:00-7:00). Água e ração para roedores foram fornecidas *ad libitum* aos animais ao longo dos experimentos.

<sup>1</sup> PEREZ, E. **Comunicação pessoal**. Curitiba: Pós-Graduação em Química. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2005

#### 4.2.3.1. Avaliação da função motora – medida da atividade geral em campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada através da observação destes em um campo aberto (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste de uma arena circular de madeira pintada de bege, com 40 cm de diâmetro e 28 cm de altura. Três círculos concêntricos dividem o fundo dessa arena em três partes que, por sua vez, são subdivididas por segmentos de reta em vinte e cinco áreas aproximadamente iguais, conforme demonstrado na Figura 6.



FIGURA 6. CAMPO ABERTO

FONTE: O autor, 2007

Cada camundongo do grupo controle e experimental foi colocado intercaladamente no centro da arena e observado durante 5 minutos. Do repertório comportamental de cada animal colocado em campo aberto, os parâmetros indicativos de sua atividade geral escolhidos para análise e quantificação foram:

- a) latência para início do movimento: Tempo que o animal leva para realizar seu primeiro movimento após ser colocado no campo aberto. Registra-se a duração desse parâmetro em segundos
- b) locomoção: uma unidade correspondente à colocação das quatro patas dentro do espaço delimitado pelas quatro linhas que compõem uma subdivisão do chão da arena.
- c) levantar: uma unidade correspondente ao movimento do apoio do animal sobre o trem posterior, sendo que as patas anteriores podem ou não estar apoiadas nas paredes laterais do campo aberto.
- d) imobilidade: Total ausência de movimentos. Registra-se a duração deste parâmetro em segundos.

O registro das freqüências dos parâmetros tempo de imobilidade e tempo de latência foram cronometricamente mensurados.

Para que os camundongos fossem induzidos aos sintomas de parkinsonismo, estes receberam uma injeção via intra-peritoneal de reserpina na concentração de 0,1 mg/mL e volume de 0,1mL por grama do peso do animal, 24 horas antes do experimento. A reserpina é um fármaco que atua bloqueando a capacidade de captação e armazenagem de aminas biogênicas, levando à depleção de noradrenalina, dopamina e serotonina em neurônios centrais e periféricos. Este fármaco desaparece rapidamente da circulação, mas seus efeitos permanecem por muito mais tempo devido à inativação irreversível dos grânulos armazenadores de catecolaminas (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Os camundongos foram distribuídos em 4 grupos:

- Grupo 1 (Grupo controle): animais não reserpinizados, que receberam salina e também foram tratados com salina
- Grupo 2: animais não reserpinizados, que receberam salina e foram tratados com extrato
- Grupo 3: animais reserpinizados e tratados com salina
- Grupo 4: animais reserpinizados e tratados com extrato

Os grupos eram constituídos por 14 animais e se utilizou como critério de

exclusão a retirada dos quatro valores de cada parâmetro cuja pontuação apresentou valores máximos ou mínimos, totalizando 10 animais por grupo. Dois animais apresentaram problemas, sendo retirados do estudo, desta forma, os grupos salina + salina e reserpina + salina totalizaram um n=9.

Os animais tratados com extrato receberam 15 minutos antes da gavagem, uma injeção intra-peritoneal de benserazida, inibidor da decarboxilase periférica, na concentração de 5mg/mL e volume de 0,1mL por grama do peso do camundongo. Uma hora após o tratamento desses animais, estes foram colocados em campo-aberto para observação. Todos os tratamentos foram realizados por gavagem, uma vez que o tratamento para a doença de Parkinson é realizado por via oral.

#### 4.2.3.1.1 Análise estatística

Os dados do campo aberto foram analisados pela ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey-Kramer, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0. Diferenças foram consideradas significantes para  $p \leq 0,05$ . Os valores foram expressos como média  $\pm$  SD.

#### 4.2.4. Quantificação de Fenólicos Totais no Extrato de *Mucuna pruriens*

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método descrito por SWAIN e HILLIS (1959), o qual utiliza o reagente de Folin-Denis e baseia-se na redução de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelos compostos fenólicos em meio básico, produzindo uma coloração azul forte que é medida espectrofotometricamente.

Para esse teste são preparados os seguintes reagentes: reagente de Folin-Denis; solução saturada de carbonato de sódio e solução padrão de ácido tânico. A curva padrão, foi estabelecida com concentrações crescentes de ácido tânico (0,2 a 1mg) e para quantificação de compostos fenólicos no extrato, foi utilizada a solução do extrato ácido de sementes pretas de *M. pruriens* na

concentração de 1g/100 mL. Em balões volumétricos de 100mL, contendo 50 mL de água; 5 mL de reagente de Folin-Denis e 10 mL de solução de carbonato de sódio. Este volume foi completado com água e agitado. Após 30 minutos as soluções finais foram filtradas e suas absorvâncias determinadas em espectrofotômetro a 760 nm. O teor de fenólicos totais foi expresso como ácido tânico, em mg/100g.

#### 4.2.5. Análise da Atividade Antioxidante da semente de *Mucuna pruriens*

##### 4.2.5.1 Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio

Este ensaio foi realizado em triplicata e preparado conforme descrito por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999).

Foram preparados os seguintes reagentes: solução de molibdato de amônio 4 mM; solução de fosfato de sódio monobásico 28 mM e solução de ácido sulfúrico 0,6 M.

No momento do ensaio, a solução reagente foi preparada da seguinte forma: 36 mL da solução de molibdato de amônio, 28 mL da solução de fosfato de sódio monobásico e 20 mL da solução de ácido sulfúrico foram reunidas e o volume foi completado para 100 mL com água deionizada.

O ensaio foi realizado com solução de levodopa 0,1 mg/mL e solução aquosa do extrato ácido de *M. pruriens* na concentração de 8,36 g extrato em 10 mL de água destilada. A concentração de levodopa corresponde à concentração dessa substância presente no extrato de mucuna.

A solução padrão de vitamina C foi preparada na concentração de 1mg/mL

A cada tubo de ensaio foram adicionados 3 mL da solução reagente a 100µL do extrato ou padrão. Estes foram incubados em banho-maria a 95°C por 90 minutos.

Após este período, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente mantendo-se protegidos da luz. A leitura das absorvâncias foi realizada a 695 nm.

#### 4.2.5.2 Ensaio de redução do radical livre DPPH

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH<sup>•</sup> foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995), em triplicata. Para avaliação da atividade antioxidante os extratos da mucuna foram reagidos com o radical estável DPPH, padrão Sigma – Aldrich D9132, em uma solução de etanol.

A redução do radical do DPPH foi medida através de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 515 nm por um período de duas horas até valores estáveis de absorção. Após sucessivos testes, com padrões antioxidantes de comportamentos cinéticos diferentes como  $\alpha$ -tocoferol, BHA, ácido gálico, quercitina e vitamina C, foi adotado um tempo padrão de leitura de uma hora (tempo necessário para que as substâncias em teste fossem oxidadas, alcançando um platô não alterado após esse período).

Para expressar a atividade antioxidante utiliza-se o EC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação ou então, pelo poder anti-radical (ARP), o qual expressa a relação inversa de EC<sub>50</sub> (ARBOS, 2004).

Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abscissas (X) representa a concentração em mg/mL e o eixo das ordenadas (Y) a % média da atividade antioxidante das triplicatas.

#### 4.2.5.3 Ensaio de redução do radical ABTS

O teste foi realizado conforme descrito por KUSKOSKI et al. (2005), baseado nos autores RE et al. (1999) e RICE EVANS e MILLER (1994), com modificações. Preparou-se uma solução catiônica de ABTS, Sigma – Aldrich, A1888, misturando em partes iguais (v:v) de solução de ABTS 7,0 mM e de solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Esta reagiu por 12 horas, em temperatura ambiente, e ausência de luz. Após formado o radical ABTS<sup>•+</sup>,

adicionou-se etanol à solução até que um valor de absorvância compreendido entre 0,700 ( $\pm$  0,1) a 0,754 nm tenha sido obtido.

A determinação da absorvância das amostras foi realizada em temperatura ambiente. Diferentes volumes da amostra diluída em etanol foram acrescentados a 2500 $\mu$ L da solução diluída do radical ABTS<sup>•+</sup>. Esta solução foi completada com etanol para que o volume de 3000 $\mu$ L fosse atingido. Após 7 minutos procedeu-se à leitura em espectrofotômetro com absorvância a 734 nm.

Para o padrão desse ensaio, utilizou-se como antioxidante de referência o Trolox (6-hidroxi - 2, 5, 7, 8 - tetrametilcromo - 2 - ácido carboxílico 97%, Sigma-Aldrich, 23883) 1,5 mM. Os resultados são expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox). O valor de TEAC é definido como a concentração do antioxidante que fornece a mesma porcentagem de inibição do Trolox (RE et al., 1999). O teste foi realizado em triplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 . PREPARO DOS EXTRATOS E IDENTIFICAÇÃO DA LEVODOPA

Para o preparo do extrato de *Mucuna pruriens* que atendesse às necessidades do estudo, diversas tentativas foram realizadas. Os principais problemas encontrados durante seu processamento foram: o acelerado processo de oxidação e conseqüente escurecimento do pó ao entrar em contato com a água, mesmo quando esta se encontrava nitrogenada; a alteração brusca de pH após a filtragem da mistura; a escolha de um ácido que não trouxesse danos aos aparelhos utilizados, que não alterasse os resultados dos ensaios e nem o comportamento dos animais e a quantidade disponível da semente de mucuna pulverizada para que o trabalho pudesse ser realizado e o rendimento final do extrato para que todo o estudo pudesse ser conduzido com um único produto.

Três extratos foram preparados, com sementes cinzas ou pretas da espécie *Mucuna pruriens*, com resultados parcialmente satisfatórios: o extrato etanólico de sementes cinzas de *M. pruriens*, o extrato ácido de sementes cinzas de *M. pruriens* e o extrato ácido de sementes pretas de *M. pruriens*. Todos possuíam colorações claras, amarela ou acastanhada, não demonstrando oxidação ativa do produto. Foi possível identificar o composto fenólico levodopa em suas composições conforme demonstrado nos cromatogramas (Figuras 7, 8 e 9), com tempo de retenção de aproximadamente 4,5 minutos e confirmados através do espectro UV a 282 nm. Os picos dessa substância estão indicados pelas setas vermelhas. No entanto, foi necessária a escolha daquele que possuísse melhores vantagens em relação aos problemas citados anteriormente.

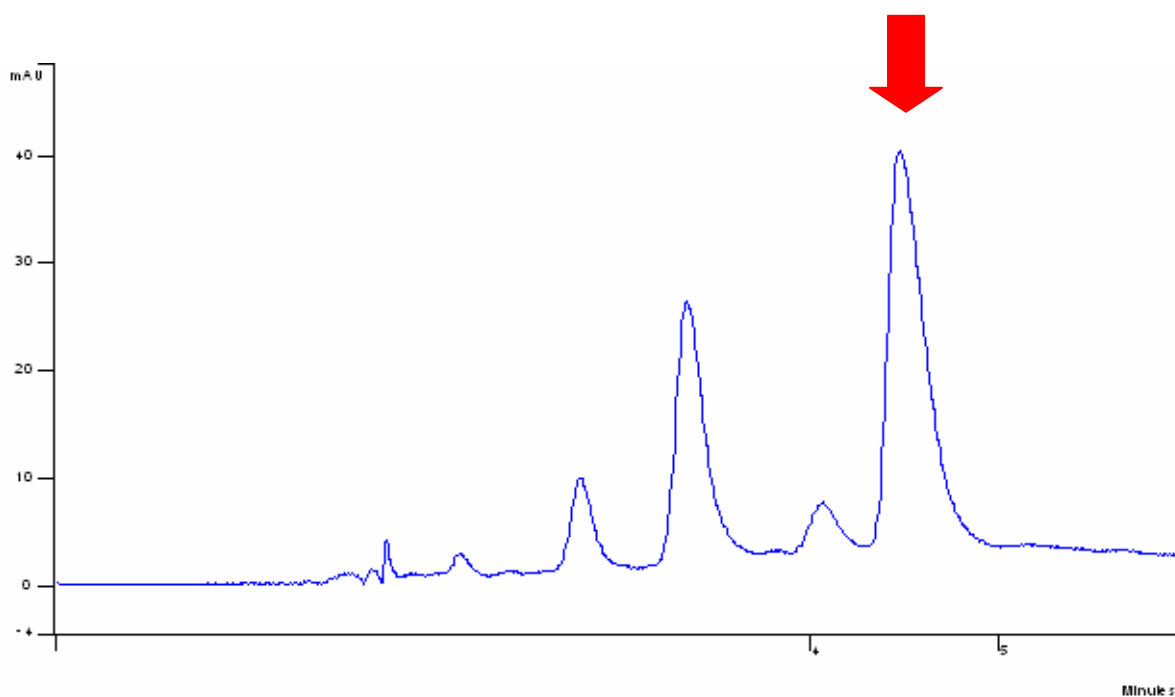


FIGURA 7. CROMATOGRAMA DO EXTRATO ETANÓLICO DE SEMENTES CINZAS DE *Mucuna pruriens* OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

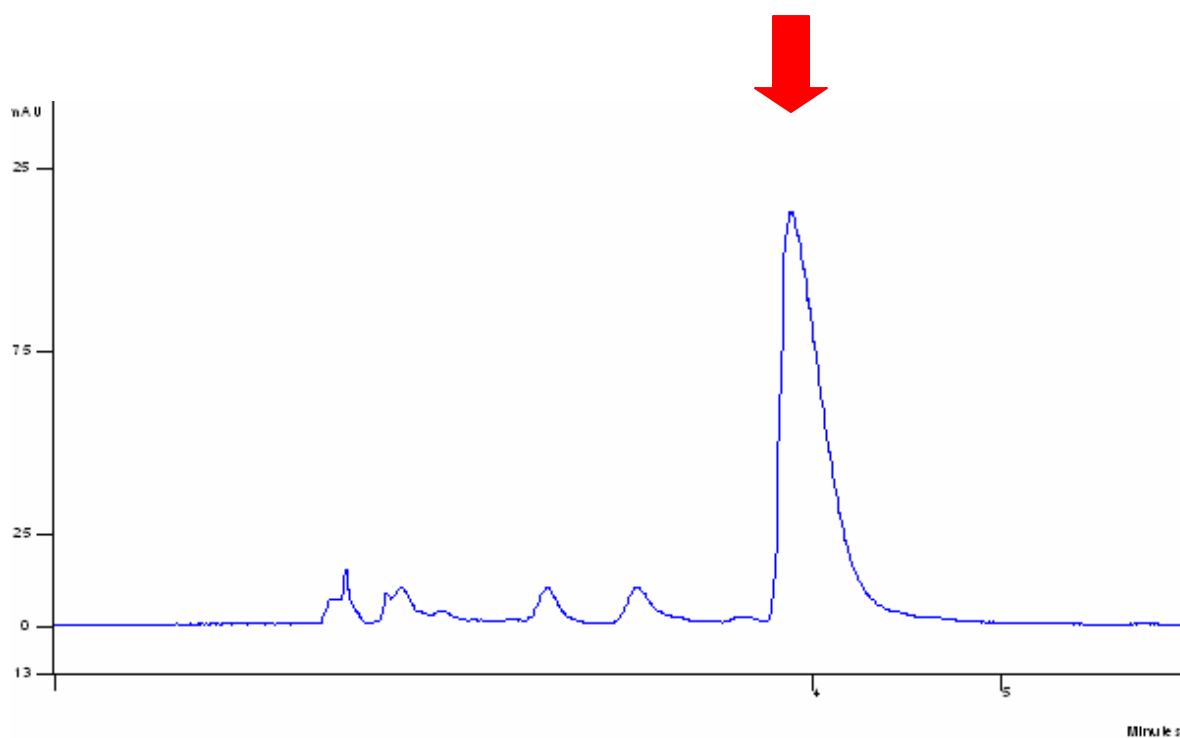


FIGURA 8. CROMATOGRAMA DO EXTRATO COM ÁCIDO ACÉTICO DE SEMENTES CINZAS DE *Mucuna pruriens* OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

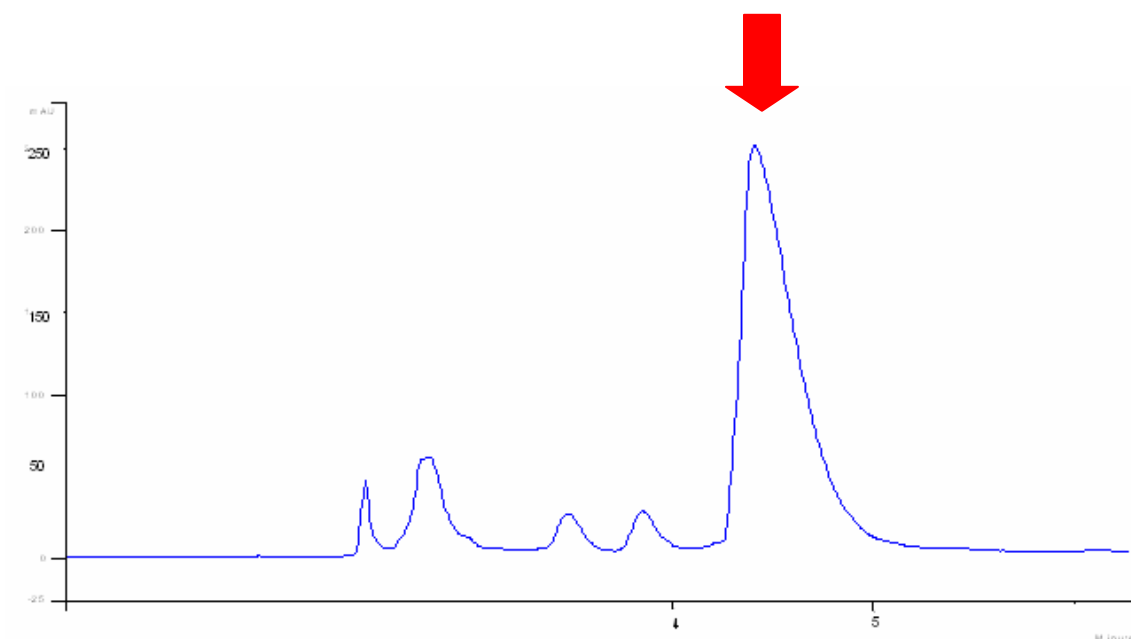


FIGURA 9. CROMATOGRAMA DO EXTRATO COM ÁCIDO CÍTRICO DE SEMENTES PRETAS DE *Mucuna pruriens* OBTIDO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O extrato etanólico preparado a partir da semente de *M. pruriens* preta apresentou rendimento extremamente baixo. Para cada 100g de pó da semente, houve um rendimento de apenas 100mg de extrato de coloração castanho clara. A concentração de levodopa nesse extrato foi de 13,51 mg de levodopa por grama de extrato. O baixo rendimento de levodopa nesse extrato foi devido ao fato desta substância ser praticamente insolúvel em álcool. Não seria possível realizar a administração desse extrato em camundongos, pois, seria necessária a diluição de 1,48 g de extrato por mL de água para a realização da gavagem, tornando-se uma solução densa e de difícil manejo. Além disso, o preparo do extrato é moroso e devido à capacidade dos equipamentos utilizados, não seria possível trabalhar com quantidades superiores a 250g de pó por extração. Desta forma, para conseguir 1g de extrato, seriam necessários 24 dias.

O extrato ácido preparado com sementes de *Mucuna pruriens* cinza apresentou um alto rendimento, com 50g da semente pulverizada foi possível obter 16,82g de extrato com concentração de 56,77 g de levodopa por grama de extrato. Ao avaliar o cromatograma desse produto, pode-se perceber que a levodopa apresenta um pico predominante e distinto das demais substâncias. No

entanto, esse extrato foi preparado com ácido acético, o que causou danos à bomba do liofilizador, além disso, este ácido causa contorção abdominal em camundongos. O pó apresentava coloração castanha clara e era altamente higroscópico, formando grumos “grudentos” após a absorção da água ambiente e tornando difícil sua diluição em água.

Para o preparo do extrato ácido de *Mucuna pruriens* preta, o ácido acético foi substituído por ácido cítrico, o qual possibilitou a acidificação do meio, sem conseqüências para o liofilizador e nem para os animais. Para a comprovação de que o ácido cítrico não afetaria o potencial antioxidante do extrato, foram realizados ensaios para a avaliação dessa atividade, com diferentes concentrações desse ácido e não foram observadas alterações na cor da solução.

Esse extrato apresentou alto rendimento, 5,4 g/ 10 g da semente em pó, com concentração de 120 mg de levodopa por grama de extrato. Apresentava coloração amarela clara e menor higroscopicidade do que o extrato realizado com ácido acético. O cromatograma apresenta picos maiores e próximos ao pico de levodopa, no entanto, esse foi selecionado para o teste em modelo animal de parkinsonismo, pois além de apresentar alto rendimento em sua produção, este também apresenta concentração mais elevada de levodopa entre outros benefícios anteriormente descritos.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA EM CAMUNDONGOS – MEDIDA DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO

A doença de Parkinson é considerada uma das principais desordens neurodegenerativas. É caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra e conseqüentemente pela diminuição nos níveis de dopamina no sistema dopaminérgico nigroestriado (WATABE; HIMEDA; ARAKI 2005), que resulta nos sintomas motores (MORRIS et al., 2000) e cognitivos da doença (MARSH et al., 2004).

Para que os animais apresentassem os sinais de parkinsonismo, foi

administrada reserpina, conforme descrito na metodologia, 24 horas antes do ensaio de campo aberto. A princípio, foi realizado para um grupo controle positivo, o tratamento com levodopa, no entanto, esta não alterou a função motora dos animais, mesmo sendo administrada previamente a benserazida. Por este motivo, este grupo foi retirado do estudo. Cabe ressaltar que esse grupo não apresentou aumento de locomoção, mas também não trouxe danos à atividade motora dos animais.

Nos parâmetros locomoção e levantar, foi possível verificar (Gráficos 1 e 2) que os animais reserpinizados apresentaram significativa redução ( $p < 0,001$ ) da atividade motora, o que possibilitou a avaliação do extrato ácido de *Mucuna pruriens*.

O Gráfico 1 apresenta diferença significativa de locomoção ( $p < 0,0001$ ) entre os grupo salina + salina e os demais grupos. Desta forma é possível avaliar que a reserpina produziu hipolocomoção, como esperado para um modelo de parkinsonismo, e o extrato não alterou este efeito da reserpina, pois não houve diferença positiva na atividade geral dos animais dos grupos reserpina + salina e reserpina + extrato.

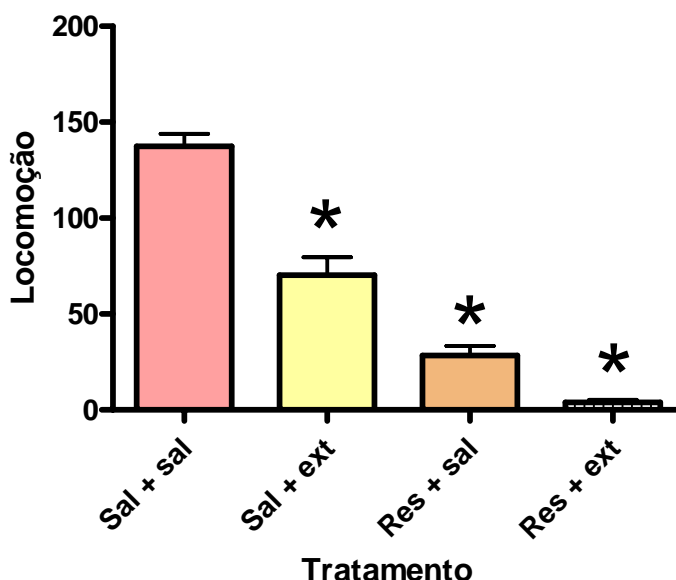


GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO DOS ANIMAIS EM CAMPO ABERTO

NOTA: Os asteriscos indicam os grupos que apresentam diferença significativa em relação ao grupo controle (salina + salina)

O Gráfico 2 ilustra a redução da frequência de levantar ( $p < 0,001$ ) dos grupos reserpina + salina, reserpina + extrato e salina + extrato em comparação ao grupo salina + salina, corroborando a hipoatividade dos animais tratados com reserpina ou extrato, verificada na frequência de locomoção dos animais.

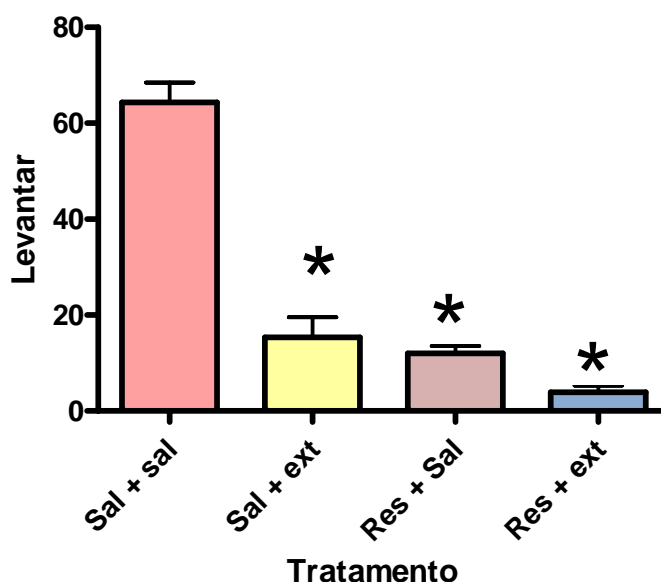


GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DE LEVANTAR EM CAMPO ABERTO

NOTA: Os asteriscos indicam os grupos que apresentam diferença significativa em relação ao grupo controle (salina + salina)

O Gráfico 3 apresenta o aumento do tempo de imobilidade dos animais do grupo reserpina+extrato em comparação ao grupo salina+salina ( $p < 0,005$ ). Este resultado sugere que a administração do extrato intensificou a hipoatividade causada pela reserpina.

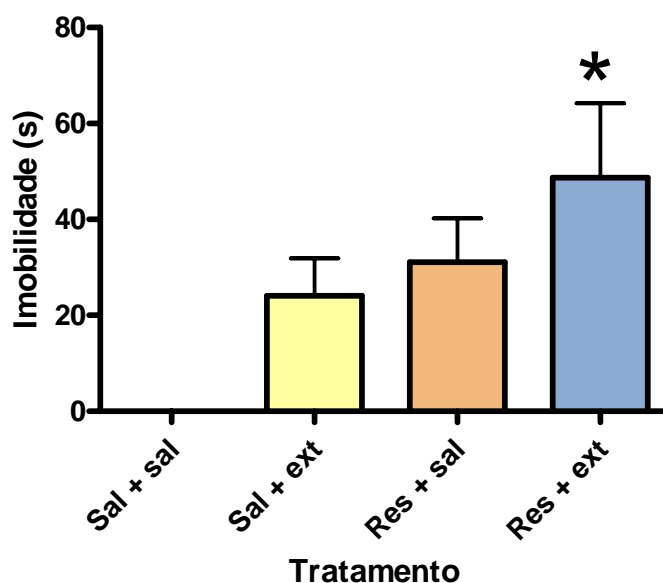


GRÁFICO 3 - TEMPO DE IMOBILIDADE, MENSURADO EM SEGUNDOS, DOS ANIMAIS OBSERVADOS EM CAMPO ABERTO, ( $p < 0,005$ ) VERSUS GRUPO SALINA + SALINA

NOTA: O asterisco indica o grupo que apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle (salina + salina)

Não houve diferença entre os grupos no parâmetro latência para início do primeiro movimento no campo aberto.

Conforme os resultados acima apresentados, uma hora após a administração de extrato ácido de *M.pruriens*, no teste do campo aberto, os animais dos grupos salina + extrato, reserpina + salina e reserpina + extrato exibiram uma redução na atividade motora geral, pois, verificou-se a redução das frequências de locomoção e de levantar além do aumento do tempo de imobilidade quando comparados aos animais dos grupos que receberam salina.

Não foram encontrados dados na literatura que descrevam a ação do extrato de *M. pruriens* em camundongos reserpinizados. De modo inesperado, verificou-se que a locomoção dos animais do grupo salina + extrato também foi menor do que aquela do grupo controle. Mais ainda, nos animais reserpinizados e tratados com extrato houve um aumento de imobilidade indicando um prejuízo da função motora destes animais. Atualmente não é possível explicar este fato, talvez outros componentes do extrato possam ter causado essa hipolocomoção. Futuros

estudos poderão auxiliar no entendimento dessa questão.

### 5.3. CONCENTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O teor de fenólicos totais no extrato ácido de *M. pruriens* preta foi de  $24 \pm 0,2 \text{g}/100 \text{g}$  de extrato. Para esta determinação empregou-se a curva de calibração realizada com o ácido tânico (Gráfico 4). Este resultado permitiu a realização da correlação entre a concentração de compostos fenólicos presentes no extrato e a concentração destas substâncias na semente utilizada para o preparo do extrato. O valor encontrado foi de 6,48g de fenólicos totais em 100 g da semente da mucuna. Este valor está próximo dos teores de compostos fenólicos encontrados por ELIAS; FERNANDEZ e BRESSANI (1979) em feijões comuns pretos (6,7g%), do teor de 5,65g% encontrado por SIDDHURAJU e BECKER (2005) na semente de *M.pruriens*, e também do teor apresentado por ADEBOWALE; ADEYEMI e OSHODI (2005) nesta mesma espécie, que encontraram  $7,75 \pm 0,02$  gramas por 100g de sementes secas.

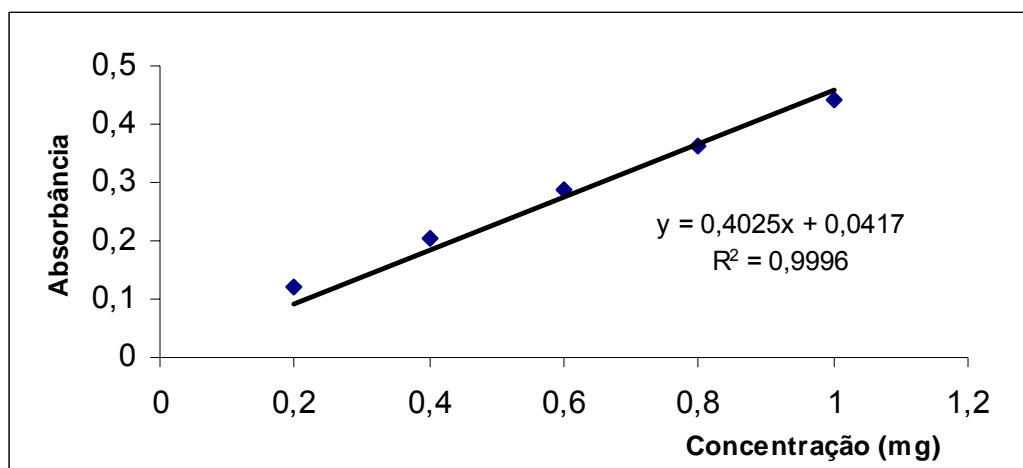


GRÁFICO 4. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ÁCIDO TÂNICO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

### 5.4 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo ARNAO (2000), entre os testes que utilizam compostos

cromógenos para avaliar a capacidade antioxidante de materiais biológicos, os mais amplos são o DPPH<sup>•</sup> e o ABTS<sup>•+</sup>, pois possuem excelente estabilidade. CAILLET, SALMIÉRI e LACROIX (2006) afirmam que, do ponto de vista metodológico, o DPPH é indicado para a avaliação dessa atividade em sucos de frutas e vegetais e em extratos de plantas devido à sua acurácia e facilidade de manipulação.

Pode-se afirmar que os resultados aqui encontrados não apresentaram interferência da coloração das soluções de levodopa e extrato, uma vez que após suas dissoluções, estas se apresentavam claras.

#### 5.4.1 Teste de Redução do Fosfomolibdênio

A escolha desse teste para a avaliação da atividade antioxidante foi devido a fatores como: metodologia já estabelecida e de baixo custo, fácil manipulação e, segundo PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999), pode ser utilizada com diferentes solventes, é indicada para avaliação de extratos, possui alta capacidade de avaliação dessa atividade, principalmente para substâncias que possuam alfa-tocoferol e outros antioxidantes potentes.

O teste foi realizado em triplicata com a solução do extrato ácido de *M. pruriens* preta e de levodopa. Concentrações crescentes dessas soluções foram submetidas à reação de óxido-redução como previamente descrito na metodologia. A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz (Figura 10). Para que seja atingido o máximo de formação do complexo de fosfomolibdênio, é necessário um período de 90 minutos. (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).



FIGURA 10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE *Mucuna pruriens* AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO.

Para a avaliação dos resultados desse teste, foi feita uma curva de calibração (Gráfico 5), com diferentes concentrações de vitamina C (10; 20; 40 e 60µg) e a leitura de suas respectivas absorbâncias. Desta forma, uma equação de reta, do tipo  $y = ax + b$ , foi estabelecida e a atividade redutora equivalente à vitamina C, substância reconhecida pelo seu poder antioxidante (VAN DUJIN; VAN DER ZEE; VAN DER BROEK, 2002), foi calculada a partir dessa equação. À  $y$  foi atribuído o valor da absorbância encontrada no teste e dessa forma calculava-se a o equivalente de vitamina C para a obtenção desse mesmo valor.

O resultado encontrado em equivalentes de vitamina C para as substâncias analisadas foi de  $0,361 \pm 0,02$  mg de vitamina C por miligrama de extrato e  $3,35 \pm 0,02$  mg de vitamina C por miligrama de levodopa. Dessa forma, é possível concluir que o extrato possui atividade antioxidante inferior à da vitamina C, no entanto, a levodopa apresenta atividade aproximadamente 3 vezes superior à vitamina C, ou seja, 10 vezes superior à do extrato.

**LEVODOPA > VITAMINA C > EXTRATO ÁCIDO DE *M. pruriens***

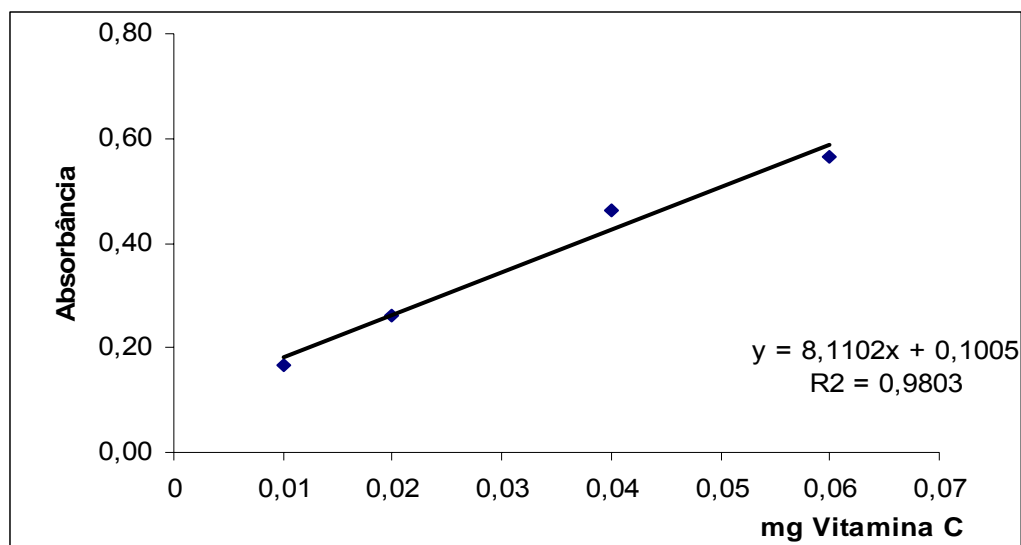


GRÁFICO 5. CURVA DE CALIBRAÇÃO FEITA COM A VITAMINA C E EQUAÇÃO DE RETA FORMADA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO

#### 5.4.2 Ensaio de Redução do Radical Livre DPPH

O radical livre DPPH<sup>•</sup> é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio etanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO, 2000). Nesse ensaio, à medida que o DPPH<sup>•</sup> sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se a mudança de coloração violeta intensa original da solução para amarela (Figura 11), cuja intensidade é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente (BLOIS, 1958).

Pode-se expressar os resultados como a capacidade de reduzir o radical DPPH em porcentagem (CHOI et al., 2002), pelo valor de EC<sub>50</sub> ou ainda através do ARP (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).



FIGURA 11: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE *Mucuna pruriens* AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO DPPH

NOTA: Concentrações diferentes foram tratadas com solução de DPPH por 1 hora a temperatura ambiente. A mudança de coloração do violeta para amarelo foi proporcional à concentração do extrato

Concentrações crescentes do extrato liofilizado de *Mucuna pruriens* preta (0,013, 0,027; 0,040; 0,053 mg/mL) foram submetidas à reação com DPPH\*. Para cada concentração testada, construiu-se a cinética da reação graficamente, pela qual se obteve a equação  $y = ax + b$ , que serviu de base para o cálculo da  $EC_{50}$  (Gráfico 6). Para o cálculo dessa equação, foi atribuído o valor 50 a y e o valor de x encontrado corresponde ao valor do  $EC_{50}$  (Tabela 2).

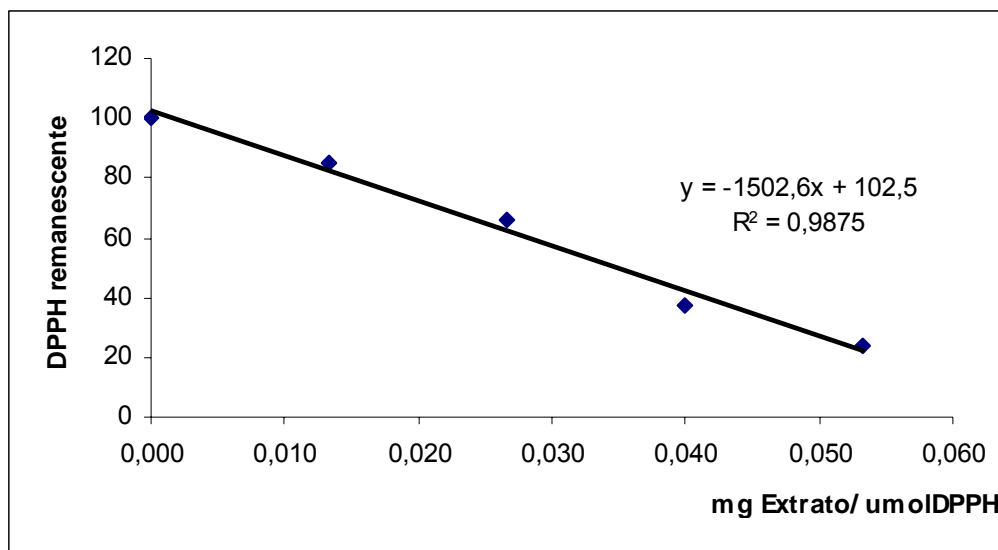


GRÁFICO 6. EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DA EC<sub>50</sub> DO EXTRATO ÁCIDO DE *Mucuna pruriens* PRETA.

TABELA 2. VALORES DO EC<sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DO EXTRATO ÁCIDO DE *Mucuna pruriens* PRETA

Extrato mg/mL	DPPH remanescente (%)	Equação da reta	EC <sub>50</sub>	ARP
0,013	85,09	$y = - 1502,6x + 102,5$ $R^2 = 0,9875$	0,035	28,62
0,027	65,96			
0,040	37,54			
0,053	23,63			

Foi avaliada também a atividade antioxidante da levodopa isolada. Foram testadas concentrações crescentes de levodopa padrão Sigma<sup>®</sup> (0,002; 0,004; 0,006 e 0,008 mg/mL), as quais mostraram-se proporcionais à concentração de levodopa presente no extrato de mucuna quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência. A curva do comportamento cinético obtida por essas diferentes concentrações está representada no Gráfico 7 e seus respectivos ARP e EC<sub>50</sub> encontram-se na Tabela 3.

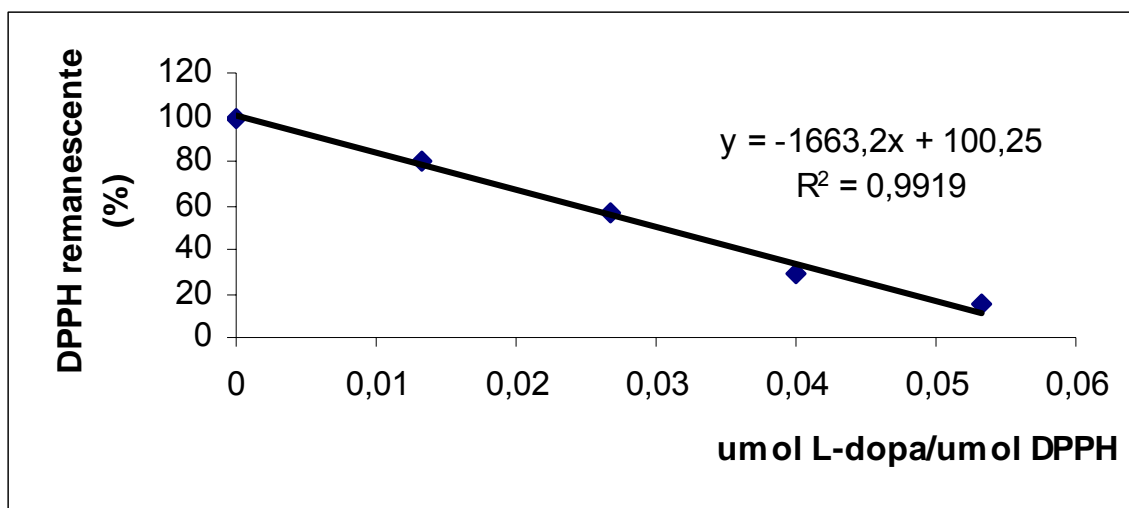


GRÁFICO 7. EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DA  $EC_{50}$  DO PADRÃO SIGMA DE LEVODOPA

TABELA 3. VALORES DO  $EC_{50}$  E PODER ANTI-RADICAL DO PADRÃO DE LEVODOPA

Levodopa Mg/mL	DPPH remanescente (%)	Equação da reta	$EC_{50}$	ARP
0,002	79,53	$y = - 1663,2x +$ $100,25$ $R^2 = 0,9919$	0,030	33,09
0,004	56,84			
0,006	28,48			
0,008	14,68			

Segundo BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER e BERSSET (1995), podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, chegando ao final da reação em menos de 1 minuto possuem cinética rápida; substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos possuem cinética intermediária e substâncias que demoram mais de uma hora para completar a reação possuem cinética lenta. Devido a essas diferenças de comportamento, foi feito um estudo da cinética da reação com vários antioxidantes de referência: ácido gálico, quercitina, BHA, alfa-tocoferol e vitamina C (Gráfico 8). Os resultados encontrados estão expressos em  $EC_{50}$  e ARP (Tabela 4).

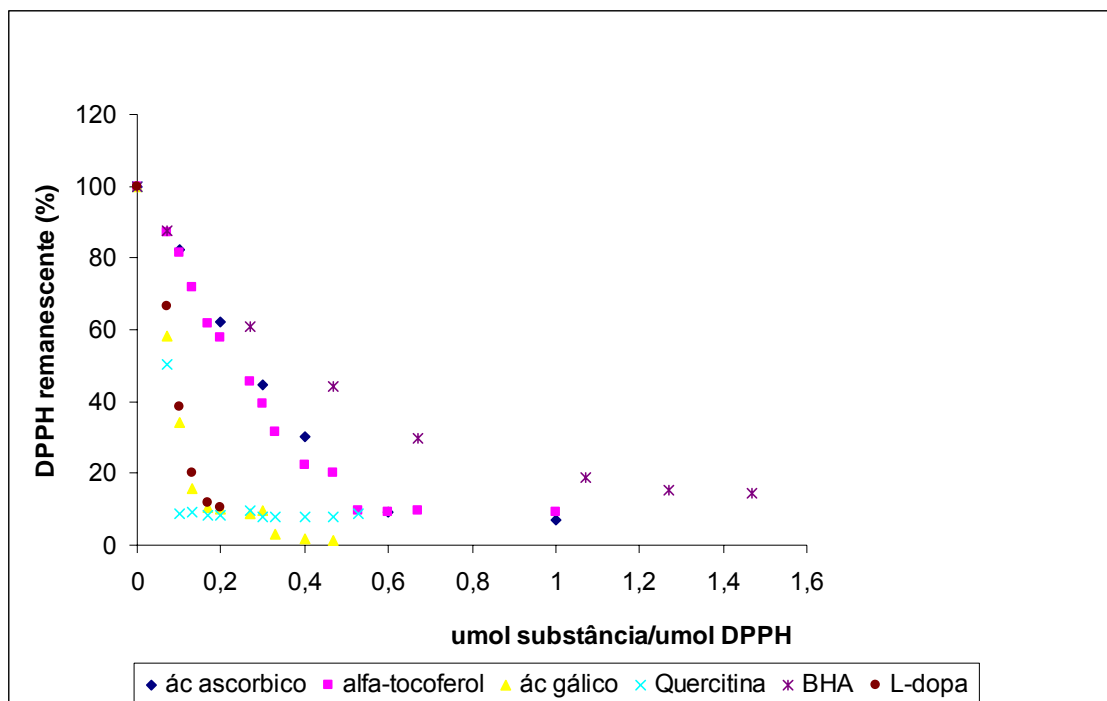


GRÁFICO 8. CURVA CINÉTICA DA REDUÇÃO DO DPPH DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Ao avaliar o comportamento cinético dessas diferentes substâncias, pode-se verificar que a levodopa possui um desempenho similar ao do ácido gálico, podendo ser classificada como uma substância de cinética lenta. Por este motivo, os testes de DPPH realizados nesse estudo reagiram durante 1 hora para que então fosse realizada a determinação da absorbância.

Os valores de ARP para ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido gálico e BHA obtidos nesse estudo estão de acordo com BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER e BERSET, (1995), já o valor do ARP para a quercitina é semelhante ao encontrado por PEYRAT-MAILLARD; BONNELLY e BERSET (2000). Comparando os valores do ARP e  $EC_{50}$ , do extrato liofilizado de *Mucuna pruriens* com os valores do  $EC_{50}$  e ARP das demais substâncias analisadas (Tabela 4), pode-se verificar que o extrato possui capacidade antioxidante superior aos padrões testados, no entanto, o padrão de levodopa apresenta atividade antioxidante superior à do extrato.

TABELA 4. COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE EC<sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DOS PADRÕES DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES COM DIFERENTES PERFIS CINÉTICOS E OS VALORES DE EC<sub>50</sub> E PODER ANTI-RADICAL DO EXTRATO ÁCIDO DE SEMENTE PRETA DE *M. pruriens* E DO PADRÃO DE LEVODOPA.

Substância antioxidante	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	ARP
BHA	0,47	2,11
Vitamina C	0,27	3,70
Alfa-tocoferol	0,26	3,85
Quercitina	0,09	10,95
Ácido Gálico	0,08	12,72
Extrato ácido de <i>Mucuna pruriens</i>	0,035	28,62
Levodopa padrão	0,030	33,09

Os resultados encontrados por RAJESHWAR et al. (2005) corroboram o resultado encontrado neste trabalho, pois os autores afirmam que o extrato metanólico de *M. pruriens* possui alta atividade antioxidante quando analisado pelo método do DPPH<sup>•</sup> e comparado a diferentes substâncias como o BHT, ácido ascórbico, quercitina e alfa-tocoferol.

Ao analisar os dados apresentados na tabela 4 é possível verificar de forma clara a atividade antioxidante das substâncias analisadas em relação à vitamina C.

**LEVODOPA > EXTRATO ÁCIDO DE *M. pruriens* > VITAMINA C**

#### 5.4.3 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical ABTS

A reação que ocorre para a determinação da atividade antioxidante por este método baseia-se na capacidade de diferentes componentes seqüestrarem o radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>. Este radical é formado através da reação entre a solução persulfato de potássio (2,5mM) e a solução de ABTS (7,0mM) (KUSKOSKI et al., 2005).

Esse método baseia-se na degradação do radical azul/verde, extremamente estável ABTS, convertendo-se a um produto róseo ou incolor. Conforme demonstrado na Figura 12, a supressão de cor devido à presença de antioxidantes na solução, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas substâncias (MILLER et al., 1993).

Os gráficos 10 e 11 permitem a comparação com a curva de calibração (Gráfico 9) do comportamento cinético da levodopa e do extrato em relação ao do Trolox. Através da equação do gráfico de cada substância, pôde-se calcular que para a redução de 50% do ABTS foi necessário 45,43  $\mu\text{g}$  de Trolox. Para esta mesma redução, é necessário 0,816  $\mu\text{g}$  de levodopa ou então 12,714  $\mu\text{g}$  de extrato. Desta forma, é possível concluir que ambas substâncias possuem atividade antioxidante superior à do Trolox, no entanto, a levodopa possui atividade superior à do extrato em aproximadamente 15,6 vezes.

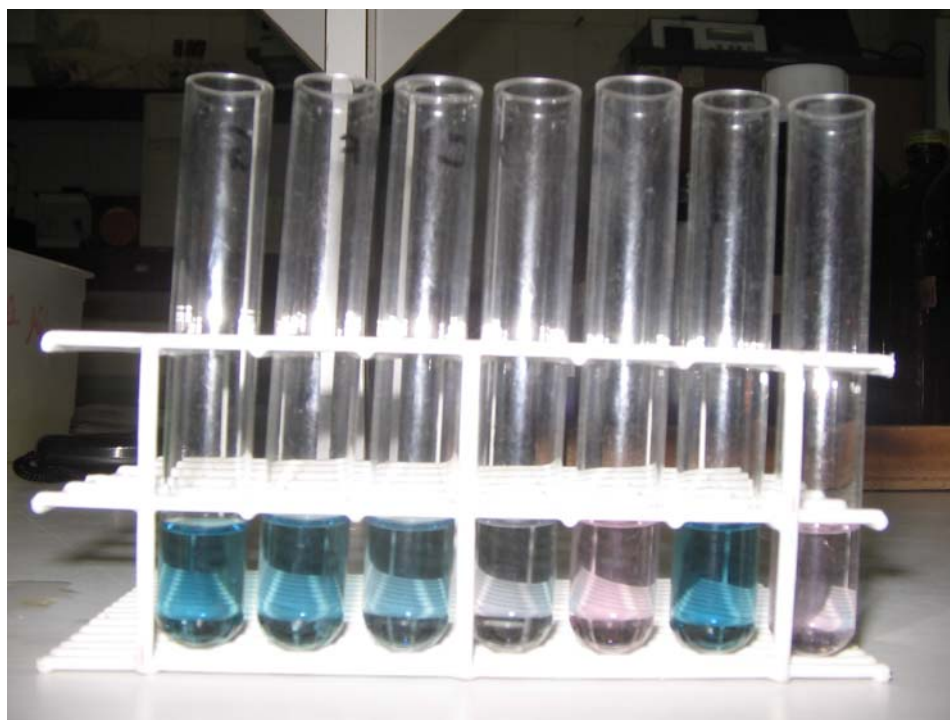


FIGURA 12. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ÁCIDO DE *Mucuna pruriens* AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL ABTS

NOTA: A mudança de coloração do verde escuro para à tonalidade rósea foi proporcional à concentração do extrato

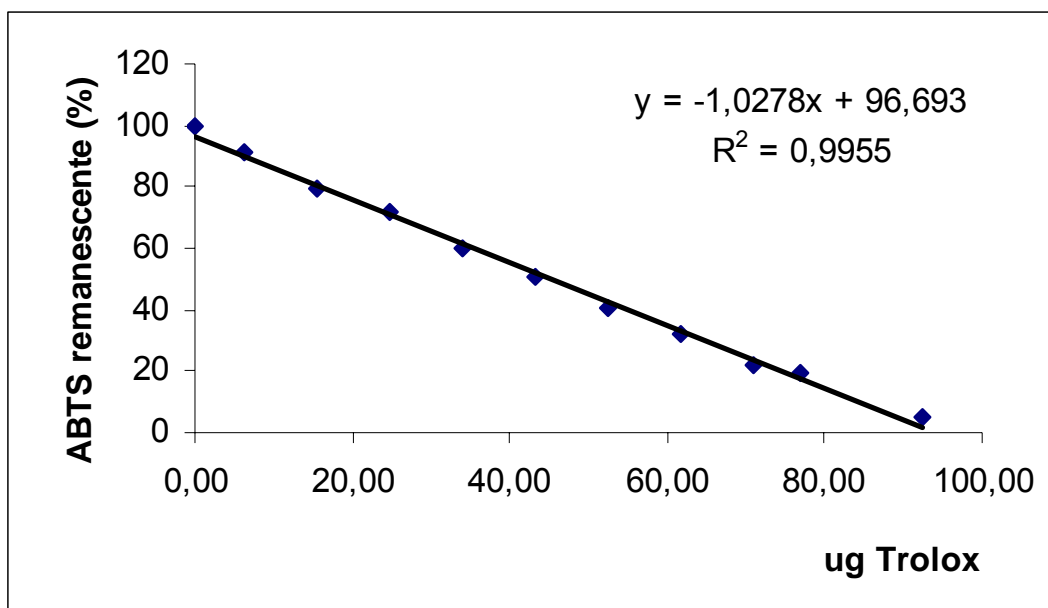


GRÁFICO 9. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DO RADICAL ABTS REALIZADA COM TROLOX

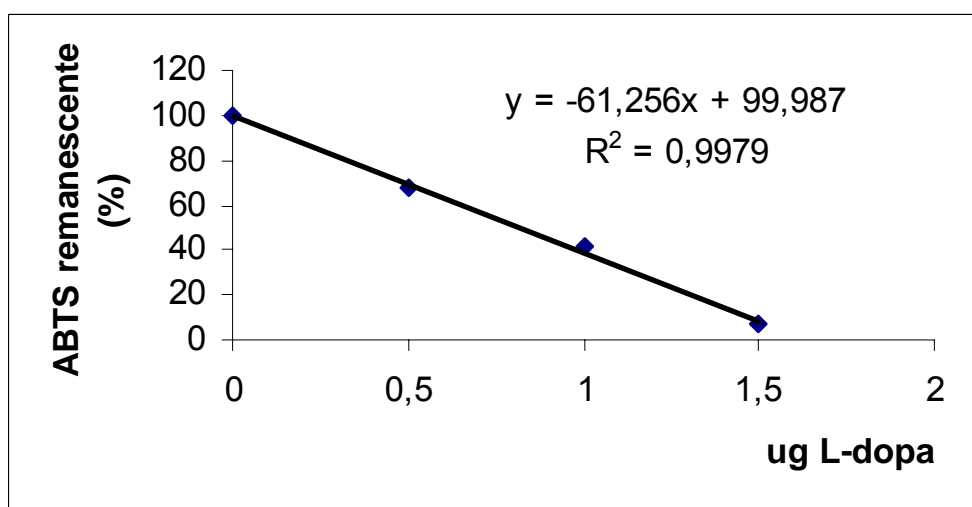


GRÁFICO 10 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DA LEVODOPA NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO ABTS<sup>•+</sup>

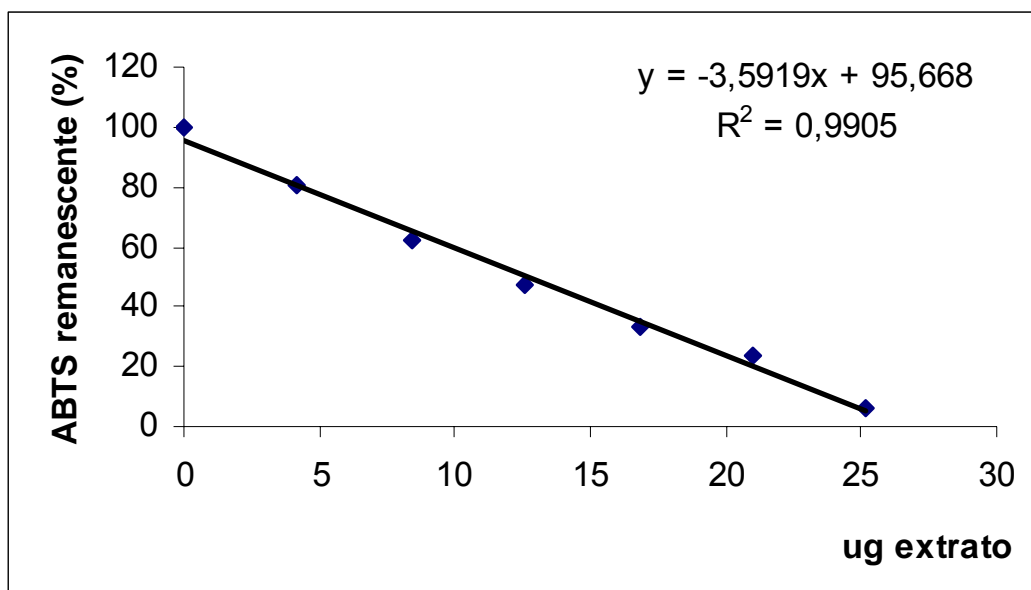


GRÁFICO 11 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO ÁCIDO DE *M. pruriens* NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO ABTS<sup>•+</sup>

Ao analisar os dados presentes no Gráfico 12 é possível verificar de forma clara atividade antioxidante das substâncias analisadas em relação ao Trolox.

**LEVODOPA > EXTRATO ÁCIDO DE *M. pruriens* > TROLOX**

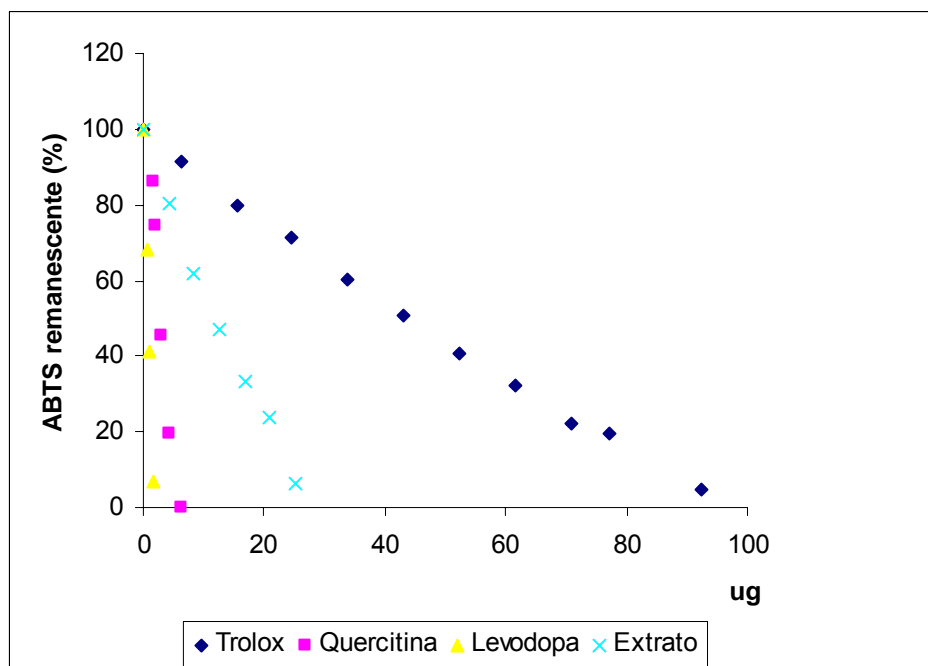


GRÁFICO 12. COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO ABTS NAS DIFERENTES SUBSTÂNCIAS ANALISADAS

Conforme descrito por ARNAO (2000) e THAIPONG et al. (2006), os testes para avaliação da atividade antioxidante através de ensaios utilizando DPPH• e o ABTS•<sup>+</sup> demonstraram atividade semelhante. A levodopa mostrou atividade superior às demais substâncias testadas. O extrato ácido de *M. pruriens* também apresentou importante atividade antioxidante, sendo superior a todos os antioxidantes de referência avaliados no ensaio de DPPH e inferior à quercitina quando avaliada pelo método do ABTS, e à levodopa em todos os ensaios realizados.

Não foram encontrados dados na literatura que façam a comparação do ensaio de redução do fosmolibdênio com demais ensaios que avaliam a atividade antioxidante. Conforme descrito por ALONSO et al. (2002), a complexidade desses ensaios impossibilita este tipo de comparação.

SIDDHURAJU e BECKER (2005) explicam que o processamento das sementes pode reduzir significativamente a concentração de fenólicos totais, fitatos, lectina e outros de seus componentes e que a água propicia a oxidação dos componentes presentes nessas sementes, principalmente o da levodopa, diminuindo, portanto, sua atividade.

Segundo RAJESHWAR et al. (2005), *M. pruriens* possui alta capacidade antioxidante quando comparada a substâncias como o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e a quercitina, no entanto, novos estudos devem ser realizados para que as substâncias que proporcionam essa atividade possam ser melhor identificadas.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu reproduzir o modelo animal de parkinsonismo induzido pela reserpina com suas alterações motoras, importantes para a pesquisa de novos fármacos capazes de prevenir ou alterar a progressão da doença de Parkinson. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o extrato de semente de *M. pruriens* utilizado não reverte os sintomas do animal e aumenta seu déficit motor sugerindo que alguma substância presente neste extrato prejudica esta função.

O extrato de *M. pruriens*, utilizado no estudo, possui elevado teor de compostos fenólicos e conseqüentemente, uma significativa atividade antioxidante. Essa atividade pode ser verificada pelos ensaios de redução do DPPH e formação do radical ABTS ao comparar diversas substâncias padrão de antioxidantes, como a vitamina C, BHT, Trolox, entre outras. Entretanto, a atividade antioxidante não justifica as superiores respostas em animais com sintomas de parkinsonismo já descritas em literatura internacional, uma vez que a levodopa, como composto fenólico isolado, apresenta superior atividade antioxidante.

A literatura acerca dos métodos para avaliação da atividade antioxidante é falha ao descrever os tipos de substâncias que reagem significativamente em cada teste. As informações por essas repassadas são apenas o diluente necessário e a indicação de uso no caso de extratos de plantas, sucos de frutas, substâncias isoladas ou compostos hifrofílicos e lipofílicos.

Avaliando os resultados apresentados, verifica-se a necessidade de um estudo mais amplo de *M. pruriens* cultivada no Brasil, para que sejam identificados os seus constituintes e conseqüentes benefícios e danos que o seu consumo pode acarretar.

## REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, A.; OSHODI, A. A. Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. **Food Chemistry**, v. 89, p. 37-48, 2005.

ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3112-3115, 2002.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 90, p. 7915-7922. 1993.

ANDERSON, D.; PHILLIP, B. J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**, v. 37, p.1015-1025, 1999.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.2, n.3, p. 145-154, 2004.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; MICHALUK, J.; MOKROSZ, M.; ROMANSKA, I.; LORENC-KOCI, E.; OHTA, S.; VETULANI, J. Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties. **Journal of Neurochemistry**, v.78, p.100-108, 2001.

ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Curitiba, 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant

activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 419-421, 2000.

ATLAS DE NEUROLOGIA. Alterações do sistema dopaminérgico. Disponível em: <<http://www.iqb.es/neurologia/atlas/lewy.htm>>. Acesso em: 01 jun. 2007.

BAILEY, E. V.; STONE, P. W. The mechanism of action of amantadine in parkinsonism: a review. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 216, p. 246-260, 1975.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHAL, P. A., FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and super oxide. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.87, p.1620-1624. 1990.

BIOSOURCING. COM LTD. **Cowhage**. Disponível em: <<http://www.mucuna.org/>> Acesso em: 05. jun.2005

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, 1958.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79. n. 3, p. 379-381, 2002

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRAVO, P. A. F.; NASSIF, M. C. Doença de Parkinson: Terapêutica atual e avançada. **Pharmacia Brasileira**, v. 55, p. 25-29, 2006.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, v.9, p.237-97, 1993.

BROADHURST, P. L. Experiments in psycho genetics. **In: Experiments in Personality**. Londres: Routledge and Kegan Paul, 1960.

CAILLET, S.; SALMIÉRI. S.; LACROIX, M. Evaluation of free radical scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. **Food Chemistry**, v. 95, p. 1-8, 2006.

CHAN, P. H.; FISHMAN. R. A. Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. **Journal of Neurochemistry**, v. 35, p. 1004-1007, 1980.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; WHANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M.Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Trends in Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p.689-95, 1993.

DAXENBICHLER, M. E.; VAN ETTEN, C. H.; HALLINAN, A.; EARLE, F. R. Seeds as sources of L-dopa. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.14, p.463-465, 1971.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n.11, p. 396-407, 1997.

DOW CHEMICAL COMPANY. Don V. Wysong. **Recovery of 3-(3,4 dihydrophenyl)-L-alanine from velvet beans**. Int. Cl. 260-519. U.S. n.3,253,023. 27 Sep 1963, 24 may 1966.

DUKE, J. A. **Handbook of legumes of world economic importance**. Nova Iorque: Plenum Press, 1981.

DUTHIE, G. G.; ARTHUR, J. R.; JAMES, W. P. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p.1061S-1063S, 1991.

ELIAS, L. G.; FERNANDEZ, D. G.; BRESSANI, R. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p. 524-527, 1979.

EUROFEDA. **Antioxidants - facts and fiction**. Disponível em: <<http://ifrn.bbsrc.ac.uk/EUROFEDA/definition.html>>. Acesso em 13. jun. 2005

FELIPPE JÚNIOR, J. Doença de Parkinson : Novas Perspectivas de Tratamento - ATP e Riboflavina. **Associação Brasileira de Medicina Complementar (dez 2004)**. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/temaDez04.asp>> Acesso em: 04 julho 2007.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, p. 236-245, 1999.

FOLEY, P.; RIEDERER, P. Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 247 Suppl. 2, p. 82-84, 2000.

FORMAN, M. S.; TROJANOVSKI, J. Q.; LEE, V. M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine**, v.10, p. 1055-1063, 2004.

FREI, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action.

**American Journal of Medicine**, v.3. supl 3a, p. 3A - 13S, Setembro, 1994.

GHOSAL, S.; SINGH, S.; BHATTACHARYA, S. K. Alkaloids of *Mucuna pruriens*: chemistry and pharmacology. **Planta Medica**. v. 19. n. 3, p. 279-284. 1971.

GIROLAMI, U. D. O sistema nervoso central. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 1171-1224

GOLD, L. S.; SLONE, T. H.; STERN, B. R.; MANLEY, N. B.; AMES, B. M. Rodent carcinogens: setting priorities. **Science**, v.258, p.261-265, 1992.

GOH, L. M.; BARLOW, P. J.; YOUNG, C. S. Examination of antioxidant activity of *Gingko biloba* leaf infusions. **Food Chemistry**, v.82, p.275-282, 2003.

GREENER-INDUSTRY. **Vanillin**. Disponível em: <[http://www.greener-industry.org/pages/vanillin/2Vanillin\\_uses.htm](http://www.greener-industry.org/pages/vanillin/2Vanillin_uses.htm)>. Acesso em 30. mai. 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. O cerebelo, os gânglios da base e o controle motor global. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 647-660.

HORIZON HERBS. **Kapikacchu, Hindu seeds - *Mucuna pruriens***. Disponível em:<[www.horizonherbs.com/group.asp?grp=46&pgNUM=2](http://www.horizonherbs.com/group.asp?grp=46&pgNUM=2)>. Acesso em 31. mar. 2007.

HUSSIAN, G.; MANYAM, B. V. *Mucuna pruriens* proves more effective than L-Dopa in Parkinson's disease animal model. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 419-423, 1997.

JACOB, R. A.; BURRI, B. J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 985S-990S, 1996.

JAY, V.; BERTHON, J. Y. New active ingredient for aging prevention. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v.113, p. 71-77, 1998.

KAAKKOLA, S.; GORDIN, A.; MANNISTO, P. T. General properties and clinical possibilities of new selective inhibitors of catechol-O-methyltransferase. **General Pharmacology**, v.25, p. 813-824, 1994.

KIYOSAWA, H. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. **Free Radical Research Communications**, v. 11, p. 23-27, 1990.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Depressores do sistema nervoso central. In: **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 9.ed. (2002/2003). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1.20 - 1.25, 2002.

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LLORACH, R.; ESPIN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea L. var. botrytis*) by products as a source of antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2181-2187, 2003.

MACHLIN, L. J. Introduction. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 669, n. 4, p. 01-06. 1992.

MANYAM, B. V. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. **Movement Disorders**, v. 5, p.47-48, 1990.

MANYAM, B. V.; DHANASEKARAN, M.; HARE, T. A. Neuroprotective effects of the antiparkinson drug *Mucuna pruriens*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 706-712,

2004.

MANYAM, B. V.; DHANASEKARAN, M.; CASSADY, J. Scott & White Memorial Hospital; The Ohio State University. **Extract of Mucuna Species and the use Thereof as Anti-parkinson's Disease Pharmaceutical.** WO 2005/092359 A1. 04 march 2004; 6 oct. 2005.

MARSH, L.; WILLIAMS, J. R.; ROCCO, M.; GRILL, S.; MUNRO, C.; DAWSON, T. M. Psychiatric comorbidities in patients with Parkinson disease and psychosis. **Neurology**, v.63, p. 293-300, 2004.

METODIEWA, D.; KOSKA, C. Reactive oxygen species and reactive oxygen species: relevance to cyto(neuro)toxicity events and neurological disorders. An overview. **Neurotoxicity Research**, v.1, p.197-233, 2000.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 95-108. 1990.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MISRA, L.; WAGNER, H. Alkaloidal constituents of *Mucuna pruriens* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p.2565-2567, 2004.

MONTEIRO, D. A. **Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR<sup>®</sup>) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta.** São Carlos, 2006. 162 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

MORRIS, M.; IANSEK, R.; SMITHSON, S.; HUXHAM, F. Postural instability in Parkinson's disease: a comparison with and without a concurrent task. **Gait and Posture**, v.12, p. 205-216, 2000.

MOTHER HERBS. *Mucuna pruriens*. Disponível em: <[www.motherherbs.com/mucuna-pruriens.html](http://www.motherherbs.com/mucuna-pruriens.html)>. Acesso em: 31 mar. 2007

MOURADIAN, M. M.; CHASE, T. N. Improved dopaminergic therapy of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 3, p.181-199, 1994.

NAGASHAYANA, N. P.; SANKARANKUTTY, P.; NAMPOOTHIRI, M. R.; MOHAN, P. K.; MOHANAKUMAR, K. P. Association of L-DOPA with recovery following *Ayurveda* medication in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 176, p.124-127, 2000.

NIELSEN, S. S. Digestibility of legume proteins. **Food Technology**. v. 45, n. 9, p.112-114. 1991.

NIKKI, E. Antioxidant activity:are we measuring it correctly? **Nutrition**, v.18, p. 524-525. 2002.

OLIVEIRA, C. P. S. Antioxidantes. **Revista Nutrição e Saúde**. - Radicais Livres FUGESP. jul/ago 1999. Disponível em: <[http://www.fugesp.org.br/nutricao\\_e\\_saude\\_conteudo.asp?id\\_publicacao=3&edicao\\_numero=4&menu\\_ordem=3](http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=3&edicao_numero=4&menu_ordem=3)>. Acesso em: 10 de mar. 2006.

OERTEL, W. H.; QUINN, N. P. Parkinsonism. In: BRANDT, T.; CAPLAN, L. R.; DICHGANS, J. **Neurological Disorders. Course and Treatment**, San Diego: Academic Press, 1996. p. 715 - 722

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical

absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.2914-2919, 2002.

PARKINSONONLINE. **Doença de Parkinson**. Disponível em: <<http://parkinson.med.br/pagina.php?q=doenca>>. Acesso em 01 mar. 2006

PELEGRINI, A. L. **O silenciamento da cinase humana Nek1 altera o reparo normal de danos ao DNA induzidos por agente alquilante**. Porto Alegre, 2005. 57 f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Biologia Molecular) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências. Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; BONNELLY, S.; BERSET, C. Determination of antioxidant activity of phenolic compounds by coulometer detection. **Talanta**, v. 51, p. 709-716, 2000.

PÓVOA FILHO, H. Radicais livres em distúrbios neurológicos e no envelhecimento. In: **Radicais Livres em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, 1995. p. 345-373.

PÓVOA, L.G.; PÓVOA FILHO, H. Radicais livres (generalidades). In: **Radicais Livres em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, 1995. p. 163-181.

PRASAD, K. N.; COLE, W. C.; KUMAR, B. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v.18, p. 413-423, 1999.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269. n.2, p. 337-341, 1999.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Transmissão Noradrenérgica. In: **Farmacologia**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. p.133-134 .

RAINTREE NUTRITION. **Feijão veludo (*Mucuna pruriens*)**. Tropical plant database. Disponível em: <<http://rain-tree.com/velveatbean.htm>> . Acesso em: 02 mar 2006.

RAJESHWAR, Y.; KUMAR, S.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K. Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (*Fabaceae*) seeds. **European Bulletin of Drug Research**, v. 13, n.1, p. 31-39, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n.9/10, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**. v. 234, p. 279-293, 1994.

ROCCO, C. S. **Peroxidação Lipídica e Antioxidantes no Lúpus Eritematoso Sistêmico**. São Paulo, 2002. 120f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

ROGERS, S.; WITZ, G.; ANWAR, M.; HIATT, M.; HEGYI, T. Antioxidant capacity and oxygen radical disease in the preterm new born. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 154, p. 544-548. 2000.

SALTMANN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars Hematology**, v. 26, p.249-256. 1989.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de**

**Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-312, 2004.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Effect of various domestic processing methods on antinutrients and *in vitro* protein and starch digestibility of two indigenous varieties of Indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3058-3067, 2001a.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Rapid reverse-phase high performance liquid chromatographic method for quantification of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds of *Mucuna* beans. **Food Chemistry**, v. 72, p. 389-394, 2001b.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Nutritional and antinutritional composition, *in vitro* amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed *Mucuna* beans (*Mucuna pruriens* var. *utilis*): an under-utilised legume. **Food Chemistry**, v. 91, p. 275-286, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 1, supl. 3C, p. 31S - 38S, 1991.

SILVA, P. C. F. **Propriedades Antioxidantes *in vitro* de Uva Branca e de Uva Tinta e de seus Respectivos Vinhos Elaborados**. Viçosa, 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior . Universidade Federal de Viçosa.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, n. 88, p. 411-417, 2004.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Tratamentos dos distúrbios degenerativos do

sistema nervoso central. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Goodman and Gilman. Mc Graw Hill: Santiago, 1996. p. 367-378.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 10, n.1, p. 63-68, 1959.

SZABO, N. J.; TEBBETT, I. R. The chemistry and toxicity of *Mucuna* species. In: **Food and Feed from Mucuna: Current Uses and the Way Forward**. 2002. p.120-141.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS., L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p. 669-675, 2006

TRIPATHI, Y. B.; UPADHYAY. A. K. Effect of the alcohol extract of the seeds of *Mucuna pruriens* on free radicals and oxidative stress in albino rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.534-538, 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS) **Agentes Oxidantes e Antioxidantes**. Bioquímica e Biologia Molecular, disciplina de bioquímica do tecido animal. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag\\_oxid\\_antioxid.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf)>. Acesso em 31 mar. 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative-stress-induced cancer. **Chemico- Biological Interactions**, v. 160, p. 1- 40. 2006.

VAN DUJIN, M. M.; VAN DER ZEE, J.; VAN DEN BROEK, P. J. Analysis of transmembrane redox reactions: interaction of intra- and extracellular ascorbate species. **Methods in Enzymology**, v. 352, p. 268-279, 2002.

WATANABE, Y.; HIMEDA, T.; ARAKI, T. Mechanism of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. **Medical Science Monitor**, v.11, n.1, p.17-23, 2005.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 969-974, 1995.

YAMAKAWA, T.; KOTAKE, Y.; FUJITANI, M.; SHINTANI, H.; MAKINO, Y.; OHTA, S. Regional distribution of parkinsonism-preventing endogenous tetrahydroisoquinoline derivatives and an endogenous parkinsonism-preventing substance-synthesizing enzyme in monkey brain. **Neuroscience Letters**, n.276, p.68-70. 1999.

**ANEXO**

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL..... 68





Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
 Setor de Ciências Biológicas  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal  
 (CEEA)



## CERTIFICADO

Nº 144

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no(a) Projeto de pesquisa abaixo especificado(a), estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CÓBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).",

**PROCESSO:** 55608/05-54      **APROVADO:** RO-07/2005    08/11/05

**TÍTULO:** "A DOENÇA DE PARKINSON E PARKINSONISMO: NOVAS ABORDAGENS TERAPEUTICAS".

**AUTORES:** Maria Aparecida Barbato Frasão Vital – responsável

**Colaboradores:** Roberto Andreatini, Ângela Reksidler Braga, Adriana Sereniki, Marcelo Meira Santos Lima, Hélio Tonelli, Caroline Capetelli e Viviane Pacheco

**DEPARTAMENTO:** Farmacologia

Curitiba, 08 de novembro de 2005.

Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi  
 Presidente do CEEA