UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VITOR AUGUSTO DOS SANTOS GARCIA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTES DE *MUCUNA* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO VISANDO CONCENTRAR O FARELO DESENGORDURADO EM L-DOPA

Maringá
Paraná – Brasil
Fevereiro de 2012

VITOR AUGUSTO DOS SANTOS GARCIA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTES DE *MUCUNA* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO VISANDO CONCENTRAR O FARELO DESENGORDURADO EM L-DOPA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Maringá

Paraná – Brasil

Fevereiro de 2012

VITOR AUGUSTO DOS SANTOS GARCIA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTES DE *MUCUNA* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO VISANDO CONCENTRAR O FARELO DESENGORDURADO EM L-DOPA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2012.

_____	_____
Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho	Profa. Dra. Camila da Silva
DEQ – UEM / Orientador	DTC – UEM / Co-Orientadora
_____	_____
Profa. Dra. Lisiane Santos Freitas	Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
DQ – UFS	DBQ – UEM

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G216e

Garcia, Vitor Augusto dos Santos
Extração do óleo de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono supercrítico visando concentrar o farelo desengordurado em L-Dopa / Vitor Augusto dos Santos Garcia. -- Maringá, 2012.
xiv, 106 f. : il. (algumas col.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho.
Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Camila da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.

1. *Mucuna*. 2. L-Dopa. 3. Extração por fluido supercrítico - Dióxido de carbono. 4. Farelo desengordurado - Semente de *Mucuna* - Atividade antioxidante - Compostos fenólicos. 5. Óleo de *Mucuna* - Ácidos graxos totais - Compostos livres de glicerol. 6. Modelagem matemática - Cinética de extração. I. Cardozo Filho, Lúcio, orient. II. Silva, Camila, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 660.284248

AMMA-00058

Aos meus pais, Valdir e Maria Filomena, e aos meus irmãos, Janaina e Rodrigo, por sempre estarem ao meu lado, por me apoiarem e serem provas vivas de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus**,** pela vida, pelas bênçãos e por este particular momento.

À minha família, pelo amor e dedicação que sempre tiveram comigo, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estiveram ao meu lado, apoiando-me e fazendo acreditar que nada é impossível.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PGA) e ao Departamento de Engenharia Química (DEQ), pela infraestrutura, materiais e equipamentos disponibilizados, os quais foram fundamentais para condução deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho, pela orientação, confiança depositada neste desafio, comprometimento profissional, pelos ensinamentos transferidos e pela amizade. E principalmente por continuar ao meu lado no desenvolvimento deste novo desafio da minha vida, o Doutorado.

Em especial, gostaria de agradecer imensamente à Prof. Dra. Camila da Silva, por quem tenho e sempre terei uma grande admiração, respeito e confiança. Muito obrigado por ter acreditado em mim no ano de 2009, mesmo considerando muitas dificuldades. Além de Orientadora, uma grande amiga. Muito obrigado, pelos ensinamentos, pelas “broncas”, pela orientação, pelos conselhos, pela dedicação, pelo apoio, por exigir sempre o melhor. Aprendi muito ao seu lado e quero continuar aprendendo. Com seu apoio, eu “cresci”. E, apesar de algumas vezes a vida tomar outros rumos, saiba que eu sempre estarei ao seu lado e apesar da minha caminhada estar apenas no começo, espero que grande parte dela seja ao seu lado. Prof. Dra. Camila da Silva, o meu MUITO OBRIGADO!

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Tecnologia Supercrítica, obrigado pelo auxílio em momentos de dificuldade, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, pela convivência, pela amizade.

BIOGRAFIA

Vitor Augusto dos Santos Garcia, filho de Valdir Martins Garcia e Maria Filomena dos Santos Garcia, nasceu em 19 de fevereiro de 1989, na cidade Naviraí – Mato Grosso do Sul.

Diplomou-se em, 16 de janeiro de 2010, em Tecnologia em Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) Campus de Umuarama.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual de Maringá, orientado pelo Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho e Profa. Dra. Camila da Silva. Em fevereiro de 2012, ingressou no curso de Doutorado em Engenharia de Alimentos, pela Universidade de São Paulo – USP.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **vii**
LISTA DE FIGURAS ..... **ix**
RESUMO ..... **xi**
ABSTRACT ..... **xiii**
1. INTRODUÇÃO **1**
1.1. Objetivos 2
1.2. Publicações 3
2. REVISÃO DA LITERATURA **6**
2.1. *Mucuna*: características e utilização 6
2.1.1. Controle de plantas daninhas 6
2.1.2. Doença de Parkinson 10
2.2. *Mucuna* e seus metabolitos 11
2.3. Atividade antioxidante 12
2.3.1. Compostos fenólicos 14
2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante 16
2.4. Óleo de *Mucuna* 17
2.5. Métodos aplicados na extração de óleos vegetais 18
2.5.1. Métodos clássicos de extração 18
2.5.2. Extração por fluido supercrítico (EFS) 19
2.7. Considerações em relação ao estado da arte 28
3. MATERIAL E MÉTODOS **29**
3.1. Materiais 29
3.2. Caracterização e preparo da matéria-prima 30
3.2.1. Moagem e granulometria do material 30
3.3. Extração do óleo das sementes de Mucuna 30
3.3.1. Extração com solvente orgânico 30
3.3.2. Extração por fluido supercrítico 31
3.4. Testes preliminares 34
3.4.1. Experimentos 34
3.5. Análises do farelo desengordurado 34
3.5.1. Extração da L-Dopa 35
3.5.2. Análise quantitativa do teor de L-Dopa 35

3.5.3. Atividade antioxidante (DPPH) 36
3.5.4. Compostos fenólicos..... 37
3.5.5. Testes de germinação em sementes de soja 38
3.6. Análise do óleo das sementes de *Mucuna* 39
3.6.1. Análise dos ácidos graxos totais..... 40
3.6.2. Análise dos compostos livres de glicerol 40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
4.1. Extrações 44
4.1.1. Extrações com solventes orgânicos..... 44
4.1.2. Extração com dióxido de carbono supercrítico 45
4.1.2.1. Testes preliminares 45
4.1.2.2. Avaliação do efeito das variáveis de processo 47
4.2. Modelagem matemática da EFS 52
4.3. Análise dos ácidos graxos totais 55
4.4. Análise dos compostos livre de glicerol 58
4.5. Quantificação de l-dopa no farelo desengordurado..... 61
4.6. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna*..... 64
4.6.1. Método DPPH..... 64
4.6.2. Compostos fenólicos..... 68
4.6.3. Relação entre a o teor de L-Dopa, CE_{50} e compostos fenólicos..... 71
4.7. Testes de germinação em sementes de soja 73
5. CONCLUSÕES 76
6. PERSPECTIVAS FUTURAS 78
7. REFERÊNCIAS 79
APÊNDICES 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Ordens de magnitude de parâmetros físicos para gases, líquidos e fluidos supercríticos 20

Tabela 2.2. Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para EFS de produtos naturais 26

Tabela 3.1. Condições experimentais empregadas para a extração do óleo das sementes de *Mucuna* a partir de dióxido de carbono supercrítico 34

Tabela 4.1. Rendimento em óleo das sementes *Mucuna* obtido por extração com solvente orgânico (diclorometano e hexano) 44

Tabela 4.2. Condições experimentais e rendimento em óleo das variedades de *Mucuna* obtidas por dióxido de carbono em condições supercríticas 49

Tabela 4.3. Condições experimentais e parâmetros do modelo de transferência de massa proposto para os dados experimentais 53

Tabela 4.4. Quantificação dos ácidos graxos totais em sementes de *Mucuna* expressos em porcentagem de massa: (a) *Mucuna aterrima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana* 56

Tabela 4.5. Identificação dos compostos presentes no óleo das sementes de *Mucuna* (CO_2, diclorometano, hexano) em condições experimentais apresentadas na Tabela 4.2 59

Tabela 4.6. Análise quantitativa dos ácidos graxos livres presentes no óleo das sementes de *Mucuna* expressos em porcentagem de massa 61

Tabela 4.7. Condições experimentais e percentual de L-Dopa presentes no farelo desengordurado obtido por diclorometano, hexano e dióxido de carbono em condições supercríticas 62

Tabela 4.8. Avaliação do potencial antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* usando o método DPPH 66
Tabela 4.9. Teor dos compostos fenólicos do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* expresso em gEAG/100g de farelo 70
Tabela 4.10. Teor de L-Dopa, CE_{50} e compostos fenólicos (C.F.) presentes no farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtido via extração supercrítica e convencional (diclorometano e hexano) 72
Tabela 4.11. Condições experimentais de extração de dióxido de carbono supercrítico e teores de L-Dopa presentes no farelo desengordurado das sementes de *Mucuna deeringiana* 73
Tabela 4.12. Valores médios de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de Soja após 7 (sete) dias de Tratamentos 74

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estrutura do composto L-Dopa.....	11
Figura 2.2.	Esquema representativo de um extrator de leito fixo e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão em sólido homogêneo.....	22
Figura 3.1.	Aparato experimental utilizado nas extrações por fluido supercrítico.....	31
Figura 3.2.	Vista geral do aparato experimental utilizado nas extrações por fluido supercrítico.....	33
Figura 3.3.	Curva de calibração do padrão L-3,4-Dihidroxifenilalanina para quantificação do teor de L-Dopa presente nas sementes de *Mucuna,* obtida por cromatografia liquida de alta eficiência.....	36
Figura 3.4.	Curva de calibração do padrão de ácido gálico obtida para a determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	38
Figura 4.1.	Extrações do óleo das sementes de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas como solvente em diferentes tamanhos de partículas	47
Figura 4.2.	Cinética de extração do óleo das sementes de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono em condições pressurizadas como solvente: (a) *Mucuna atterima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana*.....	51
Figura 4.3.	Modelos matemáticos de segunda ordem para as diferentes curvas cinéticas experimentais de extração do óleo das sementes usando CO_2 supercrítico. (a) *Mucuna aterrima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana*.....	54
Figura 4.4.	Cromatograma representativo da extração de óleo das sementes de *Mucuna*	58
Figura A.1.	Cromatogramas obtidos a partir do padrão de L-Dopa (L - 3,4-Dihidroxifenilalanina).....	101

Figura A.2. Cromatogramas do óleo das sementes de *Mucuna deeringiana* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C – 250 bar. (a) *Mucuna aterrima*; (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana*. 102
Figura B.1. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* cruas. 103
Figura B.2. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C - 150 bar. 104
Figura B.3. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 60 °C - 176,7 bar. 104
Figura B.4. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 60 °C - 244,1 bar. 105
Figura B.5. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C - 250 bar. 105
Figura B.6. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos por solventes orgânicos (diclorometano). 106
Figura B.7. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos por solventes orgânicos (hexano). 106

RESUMO

GARCIA, Vitor Augusto dos Santos, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, Fevereiro de 2012. **Extração do óleo de sementes de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono supercrítico visando concentrar o farelo desengordurado em L-Dopa**. Orientador: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho; Coorientadora: Profa. Dra. Camila da Silva.

Mucuna é uma leguminosa, típica de regiões tropicais e subtropicais, sendo muito utilizada por possuir potencial alelopático devido à presença de L-Dopa, que impede o crescimento de plantas daninhas. L-Dopa também é utilizada para o tratamento da doença de Parkinson e pode atuar como agente antioxidante. Dentro deste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a extração do óleo das sementes de *Mucuna* variedades *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, utilizando dióxido de carbono em condições pressurizadas, diclorometano e hexano como solventes, visando a concentrar o composto L-Dopa no farelo desengordurado. Os experimentos com dióxido de carbono supercrítico (CO_2) foram conduzidos em uma unidade de escala laboratorial, em temperaturas de 40 °C a 60 °C, pressão de 150 bar a 250 bar e fluxo do solvente constante em 3 mL min^{-1}. Determinou-se no farelo desengordurado o teor de L-Dopa, atividade antioxidante, compostos fenólicos e o efeito da aplicação do mesmo em sementes de soja. A análise qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos totais e compostos livres de glicerol no óleo das sementes de *Mucuna* também foi avaliadas. A modelagem matemática foi realizada, aplicando-se o modelo empírico de segunda ordem. Os resultados obtidos indicaram rendimentos de óleo a partir do CO_2 na faixa de 2,13 % a 4,59 %, sendo a condição experimental de 250 bar e 40 ° C a que apresentou o maior rendimento em óleo, condizentes com os teores de L-Dopa apresentados (3,02 % a 5,39 %), indicando que a extração com CO_2 supercrítico (EFS) é uma técnica eficiente para concentrar este composto. Em relação ao solvente orgânico, o maior percentual de óleo foi obtido a partir do hexano (5,22 % a 7,44 %), porém o teor de L-Dopa foi menor (2,19 % a 3,19 %). As diferentes temperaturas e pressões investigadas neste estudo não revelaram diferenças significativas em relação

ao perfil dos ácidos graxos totais (AGT) para EFS, considerando um nível de significância de 5%, sendo que os principais AGT identificados no óleo das sementes de *Mucuna* foram o ácido linoleico, o ácido palmítico, o ácido oleico e o ácido linolênico. Na fração de compostos que não está ligada ao glicerol foram quantificados os ácidos graxos livres (AGL) e estes apresentaram teores abaixo de 5 %, em todos os óleos investigados. Na EFS, a condição experimental de 176,7 bar - 60 °C e diclorometano foram os que apresentaram os maiores percentuais de compostos fenólicos, 6,51 EAG $100g^{-1}$ e 6,29 EAG $100g^{-1}$, respectivamente. O farelo desengordurado das sementes de *Mucuna cinerium* foi a variedade que apresentou a maior atividade antioxidante (CE_{50} de 20,38 µg mL^{-1}). Na presença do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna deeringiana,* as sementes de soja não apresentaram diferença significativa no percentual de germinação, no entanto, a aplicação do mesmo influenciou significativamente o IVG (índice de velocidade de germinação) em relação ao tratamento controle. O modelo matemático aplicado aos dados experimentais na extração com CO_2 em condições pressurizadas se ajustou em todas as condições operacionais para a extração do óleo de *Mucuna.*

Palavras-chave: *Mucuna,* L-Dopa, extração por fluido supercrítico, dióxido de carbono.

ABSTRACT

GARCIA, Vitor Augusto dos Santos, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, February de 2012, **Extraction of oil from seeds of *Mucuna* using supercritical carbon dioxide defatted bran in order to concentrate on L-Dopa**. Adiviser: Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho; Co-adiviser: Profa. Dra. Camila da Silva.

Mucuna is a legume, typical of tropical and subtropical regions and is widely used because it has allelopathic potential due to the presence of L-Dopa, which prevents the growth of weeds. L-Dopa is also used to treat Parkinson's disease and can act as antioxidant. Within this context, the main objective of this study was to investigate the extraction of oil from the seeds of *Mucuna* varieties *Mucuna aterrima*, *Mucuna cinerium* and *Mucuna deeringiana* using carbon dioxide in pressurized conditions, dichloromethane and hexane as solvents in order to concentrate the compound L-Dopa the defatted meal. The experiments with supercritical carbon dioxide (CO_2) were conducted in laboratory scale unit at temperatures of 40 °C to 60 °C, pressure 150 bar to 250 bar and flow of the solvent constant 3 mL min^{-1}. It was determined in the defatted bran content of L-Dopa, antioxidant activity, phenolic compounds and the effect of the application in soybean seeds. The qualitative and quantitative analysis of total fatty acids and free glycerol compounds in *Mucuna* seed oil are also reported. Mathematical modeling was performed by applying the empirical model of second order. The results indicated oil yields from the CO_2 in the range from 2.13% to 4.59%, the experimental condition of 250 bar and 40 °C showed the highest oil yields, consistent with the levels of presented L-Dopa (3.02% to 5.39%) indicating that the supercritical fluid extraction (SFE) is an effective technique to concentrate this compound. In relation to organic solvent, the highest percentage of oil was obtained from hexane (5.22% to 7.44%), but the content of L-Dopa was smaller, (2.19% to 3.19%). The different temperatures and pressures investigated in this study revealed no significant differences in relation to the profile of total fatty acids (TFA) to SFE, considering a significance level of 5% ($p > 0.05$), and the main FFA identified in the oil *Mucuna* seeds were linoleic acid, palmitic acid, oleic acid and linolenic acid. In the fraction of

compounds that are not linked to glycerol were quantified free fatty acids (FFA), and these showed levels below 5% in all the oils investigated. In the experimental condition of EFS 176.7 bar - 60 °C and dichloromethane were those with the highest percentages of phenolic compounds, 6.51 EAG $100g^{-1}$ and 6.29 EAG $100g^{-1}$, respectively. And the defatted meal of seeds of *Mucuna cinerium* was the variety with the highest antioxidant activity, obtaining an EC_{50} value of 20.38 µg mL^{-1}. The seeds of soybean meal in the presence of defatted seeds of *Mucuna deeringiana* no significant differences in germination percentage, however, its implementation has significantly influenced the IVG (germination speed index) compared to control treatment. The mathematical model applied to experimental data on extraction with CO_2 in pressurized conditions were adjusted in all operating conditions for oil extraction of *Mucuna*.

Key words: *Mucuna*, L-Dopa, supercritical fluid extraction, carbon dioxide.

1. INTRODUÇÃO

Mucuna é uma leguminosa da família Febaceae típica de regiões tropicais e subtropicais (GUERRANTI et al., 2001; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009a; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009b; SCIRÈ et al., 2011). A produção de sementes atinge 1,5 a 2 toneladas/hectares e o rendimento de folhas frescas e hastes 20 a 30 toneladas/hectares, sendo considerada uma leguminosa com grande produtividade (SATHIYANARAYANAN; ARULMOZHI, 2007).

Além de apresentar crescimento rápido, a *Mucuna* pode ser utilizada para adubação verde (EZEAGU et al., 2002; SIDDHURAJU; BECKER, 2005) e suas sementes possuem capacidade nutricional comparada à soja (PRAKASH et al., 2001; ADEBOWALE et al., 2005; ADEBOWALE et al., 2007). Estudos reportam que as sementes de *Mucuna* impedem o crescimento de plantas daninhas (FURUBAYASHI et al., 2007), devido à presença de L-Dopa que confere a capacidade alélopatica da *Mucuna.* E tem sido aplicada em grandes culturas, a fim de verificar seu efeito no desenvolvimento do plantio, como indicativo de boa ou não produtividade (VARGAS-AYALA et al., 2000; HAN et al., 2008, CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009). SOARES et al. (2006) reportam o efeito da aplicação de L-Dopa em sementes de soja, cujos resultados demonstram que a cultura tem grande disposição para receber influência deste aleloquímico.

A literatura ainda relata a utilização deste composto no tratamento da doença de Parkinson (BONIS et al., 2010; JAUNARAJS et al., 2011; LIPSKI, et al., 2011) e seu potencial de atuar como agente antioxidante (EBIHARA et al., 2011; SOARES et al., 2011; RANDHIR et al., 2006).

De acordo com Adebowale et al. (2005), as sementes de *Mucuna* são fontes de lipídios (aproximadamente 9,65 mg g^{-1}). O óleo das sementes de *Mucuna* é rico em ácidos graxos, incluindo a família do ômega-3 e ômega-6 (EZEAGU et al., 2005; AJAYI et al., 2006). Em humanos, os ácidos linoleico (C18:2n6, AL) e α-linolênico (C18:3n-3, ALL) mantêm em condições normais as membranas celulares, a função cerebral e a transmissão de impulsos nervosos. Estes ácidos também participam da transferência de oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, síntese de hemoglobina e divisão celular e são chamados

essenciais, pois não são sintetizados pelo organismo (MARTIN et al., 2006; CARVALHO et al., 2011).

A utilização de técnicas como prensagem mecânica e a utilização de solventes orgânicos aquecidos próximo ao seu ponto de ebulição são relatadas na literatura como métodos clássicos para remoção de óleo presente em sementes (NIMET et al., 2011). No entanto, métodos convencionais utilizados para a extração de óleos vegetais, usando solventes orgânicos, apresentam como desvantagem a degradação térmica e a necessidade de novas etapas para a remoção dos solventes (GARCÍA-RISCO et al., 2011).

A extração por fluido supercrítico (EFS) é descrita na literatura como uma alternativa aos métodos clássicos de extração (ARIAS et al., 2009). A obtenção de óleos vegetais a partir de EFS é reportada recentemente (FREITAS et al., 2008; SOUZA et al., 2008; CORSO et al;. 2010; PEDERSSETTI et al., 2010; MHEMDI et al., 2011; NIMET et al., 2011). Dióxido de carbono supercrítico apresenta vantagens quando comparado a solventes orgânicos, pois possui propriedades variando entre gás e líquido e não possui a necessidade de remover o solvente no final do processo, como na extração de óleo utilizando solventes orgânicos. A temperatura e a pressão selecionada fazem do CO_2 um solvente natural para o processo de extração de óleo (BRUNNER, 2005; HUISDEN et al., 2010). O dióxido de carbono é comumente usado como solvente na EFS, principalmente devido às suas propriedades físicas e químicas, como baixa pressão (73,82 bar) e temperatura (31 °C) critica e inércia química (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; SAHENA et al., 2009).

Diante do exposto acima, a remoção do óleo de sementes de *Mucuna,* por meio da EFS, utilizando dióxido de carbono supercrítico, poderá concentrar este importante aléloquimico no farelo desengordurado, uma vez que L-Dopa apresenta uma baixa solubilidade neste solvente (MELO et al., 2005), sendo esta a principal finalidade do presente trabalho.

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é a extração do óleo das sementes de *Mucuna* (*Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*), utilizando como solvente o dióxido de carbono supercrítico visando a concentrar, no

farelo desengordurado, o L-Dopa. O alcance do objetivo geral do trabalho se fará por meio do alcance dos seguintes objetivos específicos:

i. Determinação experimental do rendimento da extração do óleo de sementes de *Mucuna,* utilizando solventes orgânicos (diclorometano e hexano) e dióxido de carbono em condições supercríticas.
ii. Obtenção das cinéticas de extração do óleo de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono em meio supercrítico avaliando o efeito de variáveis de processo (temperatura, pressão e densidade) sobre o rendimento em óleo;
iii. Proposição de modelo matemático para descrição das cinéticas de extração do óleo de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono em condições pressurizadas;
iv. Caracterização química dos extratos obtidos em termos de ácidos graxos livres (AGL) e ácidos graxos totais (AGT) nas diferentes condições experimentais;
v. Quantificação do teor de L-Dopa presente no farelo desengordurado das sementes de *Mucuna*;
vi. Avaliação da a atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna,* bem como a quantificação do teor de compostos fenólicos.
vii. Avaliação do o efeito da aplicação do farelo desengordurado de *Mucuna deeringiana,* obtido após extração do óleo com dióxido de carbono supercrítico sob o índice de velocidade de germinação e a taxa de germinação de semente de soja (*Glycine Max L. Merril*).

1.2. Publicações

Cabe ressaltar que, durante a realização deste trabalho, os seguintes artigos estão em processo de submissão para publicação em periódicos:

i. “Extraction of *Mucuna* (*Mucuna aterrima - Mucuna cinerium – Mucuna deeringiana*) Seed Oil Using Compressed Carbon Dioxide”, GARCIA, V. A. S., CABRAL, V. F., SILVA, C., CARDOZO-FILHO, L. (Journal Agricultural and Food Chemistry).

ii. “Application of *Mucuna deeringiana* defatted bran obtained via extraction with supercritical CO_2 in soybean seeds”, GARCIA, V. A. S., FERRARESE-FILHO, O., MADUREIRA, E. H., CARDOZO-JUNIOR, E. L., CABRAL, V. F., SILVA, C., CARDOZO-FILHO, L. (Acta Physiologiae Plantarum).

iii. “Total free phenolics and antioxidant activity in *Mucuna* variety aterrima, cinerium and deeringiana”, GARCIA, V. A. S., CABRAL, V. F., SILVA, C., CARDOZO-FILHO, L. (Food Chemistry).

Os trabalhos citados abaixo foram publicados em Anais de Congressos:

i. “Aplicação do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna deeringiana* obtidos via tecnologia Supercrítica em sementes de soja”. SANTOS, E. M., GARCIA, V. A. S., LEMOS, C. O. T., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L. VII EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica, 2011, Maringá, PR.

ii. “Efeito da Aplicação do farelo desengordurado de *Mucuna deeringiana* CV sobre a germinação de sementes de soja”. GARCIA, V. A. S., SANTOS, E. M., LEMOS, C. O. T., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L. 6° Congresso Internacional de Bioenergia, 2011, Curitiba, PR.

iii. “Extração do óleo das sementes de *Mucuna aterrima* (preta) com CO_2 supercrítico”. GARCIA, V. A. S., ANDRADE, S. B., GONCALVES, R. M., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L. 6° Congresso Internacional De Bioenergia, 2011, CURITIBA, PR.

iv. “Extração do óleo das sementes de *Mucuna Cochinensis* a partir de dióxido de carbono em condições pressurizadas”. GARCIA, V. A. S., ABDALA, A. C. A., ANDRADE, S. B., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L. VII EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica, 2011, Maringá, PR.

v. “Extração do óleo de sementes de *Mucuna deeringiana* cv utilizando dióxido de carbono supercrítico”. GARCIA, V. A. S., GONCALVES, R. M., LEMOS, C. O. T., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L. III EPEA - Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos, 2011, Guarapuava, PR.

vi. “Extração em condições pressurizadas do óleo de *Mucuna pruriens*: rendimento e quantificação de ácidos graxos totais”. COLMANETTI, L. P., GARCIA, V. A. S., SILVA, C., CARDOZO FILHO, L., OLIVEIRA, R. F. IX COBEQ - Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica / IV SEQ - Simpósio de Engenharia Química, 2011, Maringá, PR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A seguir, é apresentado como forma de embasamento teórico do presente trabalho alguns conceitos em relação às sementes de *Mucuna* das três variedades selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho (*Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*). Apresentam-se os conceitos dos processos de extração por Soxhlet e da extração por fluido supercrítico, bem como métodos de análise para determinar a atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e a caracterização química do óleo.

2.1. *Mucuna*: características e utilização

2.1.1. Controle de plantas daninhas

A alelopatia é uma ciência que adquire crescente importância no âmbito da investigação agrária, pois substâncias alelopáticas mantêm o combate natural contra as pragas, a invasão de parasitas e ervas daninhas nas plantações. Os efeitos alelopáticos podem ser atribuídos por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Os produtos químicos mais comuns responsáveis pelos efeitos alelopáticos pertencem aos grupos dos ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, derivados do ácido benzóico, etileno, saponinas, taninos, quinonas complexas e flavonóides (RODRIGUES; LOPES, 2001; SOUZA; FURTADO, 2002; TOKURA; NÓBREGA, 2006). Segundo Gatti et al. (2004) e Singh et al. (2005), os aleloquímicos podem ser liberados pelas folhas verdes maceradas, lixiviados de folhas secas, volatilizados das folhas, exsudados das raízes ou liberados durante a decomposição de restos de plantas.

De acordo com Rice (1984), alelopatia é a capacidade dos vegetais produzirem substâncias químicas que, quando liberadas no ambiente, influenciam de forma favorável ou desfavorável o desenvolvimento de outros organismos.

Substâncias consideradas metabólitos secundários não estão envolvidas em funções vitais de plantas, geralmente não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e, às

vezes, bem complexas. Os efeitos alelopáticos são medidos por meio de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, ácidos graxos, peptídeos, entre outros. Esses compostos químicos podem estar presentes, em maior ou menor proporção, nas folhas, ramos, raízes, caules e sementes. A liberação dos mesmos no meio ambiente se dá pela decomposição de resíduos vegetais, lixiviação, volatilização, exsudação pelas raízes, sendo a maioria proveniente do metabolismo secundário vegetal que na evolução das plantas tiveram alguma vantagem contra a ação de microrganismos (ERASMO et al., 2004; MARASCHIN-SILVA, 2004). Dentre as substâncias químicas que atuam nessa interação, podem ser destacadas as saponinas, os taninos e os flavonóides (MALHEIROS; PERES, 2001; SANTOS, 2004)

Mucuna é uma leguminosa da família Febaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, difundida em regiões do Sul e Sudeste da Índia (GUERRANTI et al., 2001; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009a; CHIKAGWA-MALUNGA et al., 2009b; SCIRÈ et al., 2011), atualmente estudada por possuir habilidades especiais, como no controle de plantas daninhas, a tolerância a pragas, a supressão de nematóides, a melhoria de aspectos físicos dos solos e por conter em suas folhas sementes e raízes um importante composto, a L-Dopa (L- 3,4-dihidroxifenilalanina) (MACHUKA, 2000; HOUNGNANDAN et al., 2000; HOUNGNANDAN et al., 2001; RAJESHWAR et al., 2005; MELO et al., 2005).

As sementes de *Mucuna* possuem capacidade nutricional comparável à soja, com semelhantes proporções de proteínas, lipídeos, minerais e outros nutrientes. São utilizadas como alimento em diversos países da Índia, Filipinas, Nigéria, Gana e outros países da América Latina. No entanto, esta utilização é limitada devido à presença de substâncias como os compostos fenólicos, as lectinas, inibidores de proteases, os quais podem interferir na digestão e absorção dos nutrientes (SIDDHURAJU; BECKER, 2005).

Além de apresentar crescimento rápido e ser utilizada para adubação verde (EZEAGU et al., 2002; SIDDHURAJU, BECKER 2005), suas sementes são ricas em proteínas (35 %), lipídeos (10,19%), minerais (cálcio, magnésio e ferro) e carboidratos (49,7 %) (PRAKASH et al., 2001; SIMOPOULOS, 2004; ADEBOWALE et al., 2005; ADEBOWALE et al., 2007). Por este motivo são

fontes potenciais em abundância para muitos países em desenvolvimento (BHAT; SRIDHAR, 2008). A alta produtividade, aliada ao baixo custo de produção, tem feito da *Mucuna* uma das principais culturas utilizadas na adubação verde no Brasil (SANTOS et al., 2009), tendo como características as três variedades estudadas nesta pesquisa:

(a) *Mucuna deeringiana* é uma leguminosa originária da África, de hábito de crescimento herbáceo, determinado e cujo ciclo, do plantio ao pleno florescimento, é de 90 a 120 dias. É uma planta própria para consórcios com culturas plantadas em espaçamentos menores uma vez que não possui hábito trepador, não competindo assim por luz. Também é própria para áreas que terão um tempo menor de disponibilidade. O espaçamento normalmente recomendado é de 50 centímetros entre filas e com 10 a 12 sementes por metro de sulco (FORMENTINI et al., 2008).

(b) *Mucuna cinerium* é uma leguminosa originária da África, de hábito de crescimento trepador (cipó), cujo ciclo, do plantio ao pleno florescimento, é de 140 a 180 dias. Plantios tardios antecipam o florescimento em algumas semanas. Produz entre 40 e 50 toneladas de massa verde, 6 a 9 toneladas de massa seca e fixa entre 180 e 350 kg de nitrogênio por hectare/safra. O espaçamento normalmente recomendado é de 50 centímetros entre filas e com 6 a 9 sementes por metro de sulco. O desenvolvimento da *Mucuna cinerium* é muito semelhante ao da *Mucuna aterrima* (FORMENTINI et al., 2008).

(c) *Mucuna aterrima* é uma leguminosa originária da África, de hábito de crescimento trepador (cipó), cujo ciclo, do plantio ao pleno florescimento, é de 140 a 180 dias. Plantios tardios antecipam o florescimento em algumas semanas. É utilizada pelos agricultores do Espírito Santo há mais de 50 anos para a adubação verde, principalmente na cultura do milho. As recomendações de corte, citadas na literatura, vão dos 90 aos 150 dias após a semeadura. O espaçamento normalmente recomendado é de 50 centímetros entre filas e com 6 a 9 sementes por metro de sulco. Ela pode ser plantada isoladamente ou em consórcio com outras culturas. Pelo fato de ser uma planta muito agressiva não tem sido recomendado o seu plantio em culturas muito adensadas. Ao final do ciclo, a *Mucuna aterrima* seca forma um manto sobre o solo de alguns centímetros. Esta camada funciona como uma excelente cobertura morta (FORMENTINI et al., 2008).

O rápido crescimento vegetativo e a aparente resistência a doenças e pragas da *Mucuna* têm contribuído para seu uso como cultura para adubo verde em regiões tropicais e subtropicais e em consórcio com outras culturas. Como benefícios, podem ser citados a supressão de ervas daninhas e redução da erosão do solo devido à densa copa e alta queda de serrapilheira, aumentando a fertilidade e estrutura do solo (HARTKAMP et al., 2002).

As sementes de *Mucuna* ocupam lugar de destaque entre as leguminosas pelo seu uso na recuperação de áreas degradadas, como forrageira na alimentação bovina, na fixação natural do nitrogênio no solo, na rotação de culturas, na descompactação do solo, causando efeitos alelopáticos e atuando no controle de nematóides do solo (BUENO et al., 2007; FURLANETTO et al., 2008).

De acordo com Abud et al. (2009), as sementes de *Mucuna* são utilizadas para adubação verde, apresentando, normalmente, grande rendimento de massa por unidade de área, constituindo-se em uma fonte importante de matéria orgânica. Possui sistema radicular bastante ramificado e profundo, o que permite extrair nutrientes das camadas mais profundas do solo, podendo ser utilizada como suplemento proteico na alimentação animal.

As sementes, de maneira geral, constituem importantes funções, como disseminação e garantia de sobrevivência das espécies vegetais, além de possuir importante papel biológico e serem utilizadas na alimentação humana e animal (MARCOS FILHO, 2005). Apesar de serem formados por embrião, tecidos de reserva e envoltório, na natureza, diversos fatores contribuem para que haja o desenvolvimento diferenciado dos componentes da semente, variando entre espécies e até dentro da própria espécie, por meio da cor, forma e tamanho.

Estudos mostraram que na América Central, sistemas de cultivo de milho, utilizando a *Mucuna*, permitem elevar os níveis de produção por ano. O sistema parece diminuir o estresse da seca, devido à camada de cobertura morta deixada pela *Mucuna*, que ajuda a conservar a água no solo. Com quantidade de água suficiente, os nutrientes se tornam disponíveis. Pesquisas mostram que a rotação anual contínua de *Mucuna* e milho pode ser sustentável por um período mínimo de 15 anos, com alto nível de produtividade (ALTIERI, 2002).

De acordo com Fujii (2001), o plantio de culturas alelopáticas como cobertura verde para o controle de ervas daninhas e redução do uso de herbicidas sintéticos e a *Mucuna* apresentou alto potencial para esta finalidade.

As sementes da *Mucuna* têm uso na manufatura de rações ou entram na alimentação direta dos animais, quando imersas em água por 24 horas ou raladas e misturadas às refeições. São usadas principalmente para alimentação de gado ou ovelhas, podendo ser empregadas na alimentação de suínos se constituírem menos de 25% da dieta. A *Mucuna* pode ser empregada na alimentação humana, mas requer cuidados na preparação, devido aos princípios tóxicos que contém (BACHMANN, 2007).

De acordo com Pretty (2006), as sementes de *Mucuna* foram usadas por várias décadas na Guatemala e no México, tostada e moída para fazer um substituto do café, sendo conhecida como “Nescafé” na região, devido ao seu uso. Os legumes verdes e as folhas são, ocasionalmente, fervidos e consumidos como um vegetal (BACHMANN, 2007). O amido presente na *Mucuna* tem potencial de uso na indústria alimentícia, em produtos que requerem alta temperatura, como geléias e produtos enlatados (BETANCUR-ANCONA et al*.,* 2002).

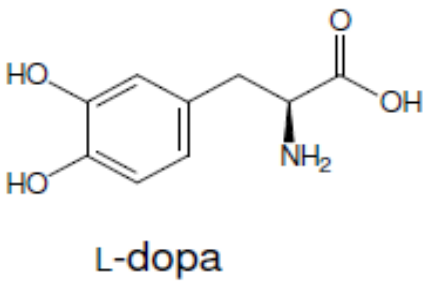
2.1.2. Doença de Parkinson

Algumas espécies do gênero leguminosa são utilizadas há muito tempo para o tratamento de doenças neurológicas, principalmente para a doença de Parkinson. Esta doença 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 e tremor ondulante (GIROLAMI, 1996). Até o presente momento não é possível curar, estacionar ou prevenir a doença de Parkinson. Os principais tratamentos utilizados atualmente são realizados com a L-Dopa. Os primeiros relatos constam do sistema de medicina tradicional da Índia (Ayurveda) (NAGASHAYANA et al., 2000). Acredita-se que a razão disso seja porque a L-Dopa é convertida no cérebro em dopamina, por ação da enzima dopa-descarboxilase (PARKINSONONLINE, 2006).

Historicamente, a *Mucuna* é utilizada no tratamento de depressão, desordens nervosas e mentais e do aparelho reprodutor, como a infertilidade masculina (TRIPATHI; UPADHYAY, 2002). Possuí ação anti-helmíntica, afrodisíaca, adstringente, analgésica e carminativa (RAINTREE et al., 2006). Tanto as partes vegetativas quanto as reprodutivas, possuem propriedades medicinais: as raízes são usadas como laxantes e aliviam a constipação, nefropatia, elefantíase, neuropatia, úlceras, febre e verminoses; as folhas são utilizadas para forragem de plantações e também para tratamento de úlceras, inflamações e enxaquecas; e as sementes que podem atuar como adstringentes, laxativos, afrodisíacos e vermífugos (AGOSTINI, 2008), além de possuir propriedades antidiabéticas (GROVER et al., 2002).

2.2. *Mucuna* e seus metabolitos

De acordo com a literatura alguns vegetais produzem L-Dopa e o primeiro relato foi em *Vicia faba* em 1920 (SCHWEIZER et al., 2000). Em *Mucuna* foi verificada a presença de levodopa em 1937 (TAWAB et al., 2001). Desde o isolamento da L-Dopa de *Vicia faba* (GANZERA; KHAN, 2001), o composto tem sido relatado em leguminosas como *Baptisia, Lupinus, Mucuna* e *Vicia* em valores acima de 1,9 %. Em análise de mais de 1000 espécies dentre 135 famílias, o gênero *Mucuna* foi considerado a melhor fonte de L-Dopa em sementes para uso comercial (PEREZ, 2009). A L-Dopa é um fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Parkinson, além de ser responsável pela capacidade alélopatica da *Mucuna*, e contribuir para a atividade antioxidante de algumas Leguminosas. A Figura 2.1 apresenta a estrutura do composto L-Dopa.



L-dopa

Figura 2.1. Estrutura do composto L - 3,4-Dihidroxifenilalanina (L-Dopa). Fonte: Perez, 2009.

Adebowale et al. (2005) avaliaram as propriedades físico-químicas, nutricionais e anti-nutricionais de sementes de seis variedades de *Mucuna* e relatam que os percentuais de L-Dopa nas sementes podem variar de 3,87 a 7,12 % de acordo com a espécie, sendo que a *Mucuna deeringiana* apresentando menor teor 3,87 % de L-Dopa. Randhir e Shetty (2004) relatam teores de L-Dopa em sementes de *Vicia faba* germinadas no escuro, de 1,0 % a 1,6 % e Chikagwa-Malunga et al. (2009) reportam percentuais em torno de 2,4 % de L-Dopa em sementes de *Mucuna pruriens*.

Além da L-Dopa, outros compostos foram encontrados em folhas de *Mucuna*, como derivados indol-3-alquilamínicos N,N-dimetiltriptamina, 5-metóxi-N,Ndimetiltriptamina, bufotenina, colina e serotonina (essa última dos tricomas da vagem) (PEREZ, 2009). Algumas tetraidroisoquinolinas foram isoladas de *Mucuna pruriens*, como a L-3-carboxi-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina e a 1-metil-3-carboxi-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidro-isoquinolina (YUAN et al., 2008).

Adebooye e Phillips (2006) reportam que as sementes de *Mucuna* são fontes de proteínas brutas, carboidratos e gorduras. Outros componentes nutricionais, incluindo o ácido ascórbico, cálcio e fósforo estão presentes em quantidades moderadas, já o conteúdo de ferro apresenta baixos níveis. A maioria das espécies de *Mucuna* exibe razoável tolerância a um número de estresses abióticos, incluindo seca, baixa fertilidade e alta acidez do solo, mas elas são sensíveis à geada e não crescem bem em solos frios e úmidos (RESENDE et al., 2009).

2.3. Atividade antioxidante

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. Os antioxidantes 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 como compostos que protegem o sistema biológico contra efeitos dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (MONTEIRO, 2006).

Um dos principais problemas na conservação dos alimentos lipídicos é o desencadeamento do processo oxidativo, que resulta na produção de odores e sabores desagradáveis, tornando os alimentos inadequados para o consumo. Como resultado da reação entre o oxigênio e os ácidos graxos insaturados, ocorre a formação de compostos de baixo peso molecular, os quais são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de odores indesejáveis. As reações oxidativas reduzem o valor nutricional, pois os ácidos graxos essenciais (linoleico e linolênico) são os primeiros a serem oxidados, produzindo diversos compostos como aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos que são potencialmente tóxicos (SPATZ, 1994).

Uma substância é considerada antioxidante quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, sendo capaz de inibir ou retardar significativamente esta oxidação (BARREIROS et al., 2006). Antioxidantes também podem ser definidos como compostos naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e possuem propriedades capazes de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2003; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Compostos antioxidantes são usualmente empregados nas indústrias de alimentos para prevenir alterações indesejáveis devido a reações de oxidação. Atualmente, existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, embora tenham que cumprir certos requisitos para seu uso em alimentos, sendo um deles a segurança para a saúde (GÓMEZ, 2003).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários ou secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou lipídio-antioxidante que podem reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa da autoxidação, por diferentes mecanismos, que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio e decomposição de hidroperóxidos (ANGELO; JORGE, 2007; LUZIA; JORGE, 2009).

Segundo Sharma e Bhat (2009), os antioxidantes são nutracêuticos considerados importantes, por apresentarem benefícios à saúde. No entanto, tem sido demonstrado que antioxidantes sintéticos podem se acumular no corpo e podem resultar em danos ao fígado e carcinogênese. Estes problemas não são encontrados com a utilização de antioxidantes naturais, extraídos de ervas e especiarias, que são potencialmente nutritivos e podem ter efeitos terapêuticos (VALKO et al., 2007; SCHERER; GODOY, 2009; DENG et al., 2011).

Os estudos de Rajeshwar et al. (2005) apresentam que o extrato metanólico de *Mucuna pruriens* possui alta atividade antioxidante quando analisados pelo método do DPPH e comparado a diferentes substâncias como o BHT (butil-hidroxitolueno), ácido ascórbico, quercitina e alfa-tocoferol. Tripathi e Upadhyay (2001) relataram uma alta atividade antioxidante em sementes de *Mucuna*.

Longhi et al. (2011) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato ácido das sementes de *Mucuna pruriens* por meio do teste de redução do complexo fosfomolibdênio, redução do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e a formação do radical monocatiônico ABTS+, proveniente do ácido [2-2'-azino-bis(3-etil-benzolina-6-sulfonado)]. Eles concluíram que as sementes de *Mucuna pruriens* possuem alta capacidade antioxidante, porém não superior à L-Dopa isolada. Este fato também foi observado por Thaipong et al. (2006). Randhir e Shetty (2004) determinaram a atividade antioxidante da L-Dopa sintética pelo método DPPH e o valor de inibição foi de 87 %, enquanto que, para o feijão fava, que possuí L-Dopa, o valor foi de 72 %.

De acordo com Du e Li (2012), as folhas de *Mucuna sempervirens* podem fornecer antioxidantes. Alcalóides, polifenóis e terpenóides são conhecidos por atuarem como agentes antioxidantes de radicais livres em plantas (BHAT et al., 2007).

2.3.1. Compostos fenólicos

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos (DECKER, 1997). Estes se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides,

estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Eles são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução (ANGELO; JORGE, 2007).

Existem diversos fenóis e, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SOUSA et al., 2007). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um importante papel na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

A atividade antioxidante dos produtos naturais é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como seqüestrante de radicais livres no organismo, reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005). As substâncias fenólicas advêm do metabolismo especial nas plantas e muitas possuem grande ação antioxidante.

Antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT) são normalmente utilizados nas indústrias de óleos e de derivados lipídicos. Entretanto, estes compostos podem apresentar alguns inconvenientes. Essas substâncias podem causar efeitos adversos, como, por exemplo, hemorragia massiva nas cavidades pleurais e peritoneais (TAKAHASHI; HIRAGA, 1978) ou extensa proliferação de células no pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma (BAUER et al., 2001; THOMPSON et al., 2001). Devido a estes inconvenientes, tem havido a preocupação na obtenção de substâncias naturais que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos.

Nos feijões comuns, o conteúdo de polifenóis varia de acordo com a coloração da casca. Segundo BRESSANI (1993), os feijões vermelhos, marrons, pretos e brancos apresentam, respectivamente, o teor médio de

compostos fenólicos de 12,6 mg g^{-1}; 7,8 mg g^{-1}; 6,6 mg g^{-1} e 2,3 mg g^{-1} de catequina.

Longhi et al. (2011) relataram que o teor de compostos fenólicos no extrato ácido das sementes de *Mucuna pruriens* foi de 24 mg g^{-1} de ácido gálico. Este valor corresponde a 6,48 mg g^{-1} de fenóis totais em sementes *Mucuna* e está próximo dos níveis de compostos fenólicos encontrados por Siddhuraju e Becker (2005), 5,65 mg g^{-1}, e também do conteúdo apresentado por Adebowale et al. (2005), nesta mesma espécie, que encontrou 7,75 mg g^{-1} de sementes secas.

2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante

Existem diversos métodos para a avaliação da atividade antioxidante. 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 – Ácido [2,2-azino-bis (3-etil-benzolina-6-sulfonado)] e o DPPH Radical (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (ARNAO, 2000; KUSKOSKI et al., 2005).

O teste DPPH é um dos mais antigos e mais frequentemente usados para a determinação da capacidade antioxidante em extratos de alimentos, sendo baseado na habilidade de doar um radical hidrogênio para o composto sintético nitrogenado DPPH (STRATIL et al., 2006). O ensaio de redução do radical livre DPPH tem sido amplamente utilizado como um método químico para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, especialmente para extratos de plantas vegetais (BRACA et al., 2001; LU; FOOD, 2001; MENSOR et al., 2001; BRACA et al., 2002).

Métodos para a medida do conteúdo de fenóis totais e determinação da capacidade antioxidante são geralmente baseados na possibilidade dos compostos fenólicos agirem como agentes redutores e fornecedores de hidrogênio ou elétron (HUANG et al., 2005).

2.4. Óleo de *Mucuna*

O óleo das sementes de *Mucuna* é rico em ácidos graxos essenciais, os quais abrangem as famílias de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, conforme relata a literatura (SIDDHURAJU e BECKER, 2005; SIMOPOULOS, 2004). Em humanos, os ácidos linoleico e α-linolênico são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos.

Os ácidos graxos essenciais não são sintetizados pelo organismo e por este motivo recebem esta denominação. Eles participam da transferência do oxigênio para o plasma sangüíneo, além da síntese da hemoglobina e da divisão celular (MARTIN et al., 2006). A incorporação de ácidos graxos essenciais em produtos da indústria alimentícia e farmacêutica é amplamente praticada (KASSIS et al., 2010; PEDERSSETTI et al., 2010; ZHANG et al., 2010; ÁLVAREZ et al., 2011; QUISPE-CONDORI et al., 2011; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011;).

Ezeagu et al. (2005) relataram que o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0), que variam de 18,01 – 20,86 % e 8,43 – 13,52 %, respectivamente, são os ácidos graxos predominantes nas sementes de *Mucuna,* sendo que o teor de ácido palmítico apresenta-se semelhante ao das sementes de soja. Os ácidos graxos insaturados que se apresentam em maiores quantidades são os ácidos oleico, linoléico e linolênico e para as variedades *Mucuna utilis*, *Mucuna cochinchinensis* e *Mucuna pruriens* (IRZ), os teores de ácidos graxos insaturados são acima de 50%.

Demuner et al. (2003) que realizaram a extração do óleo do caule e das raízes de *Mucuna cinerea*, utilizando como solvente etanol em aparelho Soxhlet, relataram que o óleo do caule de *Mucuna* é constituído dos seguintes ácidos graxos: mirístico (4%), palmítico (61%), esteárico (13%), oléico (7%), linoléico (4%) e icosanóico (2%).

Ajayi et al. (2006) relataram que as leguminosas subutilizados da Nigéria, *Brachystegia eurycoma*, *Tamarindus indica* e *Mucuna flagellipes*, contém teores do ácido linoleico, que é considerado um dos três ácidos graxos essenciais e ainda apresentam proporções dos ácidos palmítico, oleico e esteárico. De acordo com Omode et al. (1995), é, sem dúvida, um dos mais

importantes ácidos graxos poliinsaturados na alimentação humana, por contribuir para a prevenção de doenças vasculares do coração.

As sementes de *Mucuna* apresentam baixos teores de ácidos graxos livres (< 4%), podendo ser armazenados por um longo período de tempo, sem apresentar o ranço oxidativo (AJAYI et al., 2006). Como o óleo das sementes de *Mucuna* é rico em ácido oleico e linoleico, demonstra ser um tipo de óleo com um elevado grau de insaturação, o que favorece seu uso para fins comestíveis ou como matéria-prima para a indústria farmacêutica, se eliminadas eventuais substâncias nocivas à saúde (TAKEMOTO et al., 2001; EZEAGU et al., 2005).

2.5. Métodos aplicados na extração de óleos vegetais

2.5.1. Métodos clássicos de extração

O método de extração mais adequado para extração do óleo de plantas irá depender se o óleo esta localizado na folha, flor, fruto, semente, casca ou raiz e se a finalidade deste óleo será para utilização em cosméticos, alimentos ou medicamentos. São relatados na literatura como métodos clássicos para remoção de óleo em sementes, técnicas como prensagem mecânica ou Soxhlet (NIMET et al., 2011). No entanto estas técnicas apresentam algumas desvantagens, como a produção de resíduos indesejáveis e a necessidade de remoção do solvente no final do processo de extração (TOPALLAR; GEÇGEL, 2000; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; PASSOS et al., 2010).

O solvente orgânico mais utilizado para a extração é o hexano. Todavia, a utilização de solventes orgânicos para a extração de óleos vegetais apresenta alguns inconvenientes relacionados à qualidade dos produtos gerados, como a periculosidade no ambiente de produção, com impacto ambiental e com custos de processamento. Os óleos vegetais são importantes fontes de produtos com altos valores agregados, como uma variedade de vitaminas, pigmentos e lipídeos fosforados que, ou são destruídos ou não totalmente aproveitados nos processos clássicos, devido ao tempo de extração e à alta temperatura empregada no processo (BOSS, 2000).

De acordo com Lameira et al. (1997), o hexano é o principal solvente orgânico utilizado para extração de óleo em plantas e alguns dos problemas

desse método é o tempo excessivo e a alta temperatura requerida para remover o solvente remanescente no produto. Estes fatores podem afetar a qualidade organoléptica do alimento.

O processo de extração por prensa mecânica realiza o esmagamento das sementes removendo parcialmente o óleo. Este procedimento pode ser precedido de um aquecimento controlado de grãos, visando, assim, a aumentar o rendimento de extração. O rendimento do óleo varia de acordo com o tipo de matéria-prima (TURATTI, 2000; KARTIKA et al., 2006).

2.5.2. Extração por fluido supercrítico (EFS)

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que está acima da sua temperatura crítica e pressão crítica. O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio. Obtemos um fluido supercrítico quando elevamos uma substância (liquido ou gás) a condições acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão. É um estado intermediário em que o fluido se encontra entre o liquido e o gás. A temperatura critica de um gás é aquela acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão (BOTT, 1982; ARIAS et al., 2009; BERNARDO-GIL et al., 2009; BRUNNER, 2010).

A EFS considera os mesmos parâmetros operacionais de transferência de massa (propriedades físico-químicas do solvente/soluto substâncias, regime de fluxo, efeito de mistura, solubilidade, afinidade química, etc.) que um processo de extração convencional (ARIAS et al., 2009; BERNARDO-GIL et al., 2009). No entanto, devido às características intrínsecas, o fluido supercrítico adquire uma densidade similar à de um líquido e simultaneamente uma compressibilidade próxima à de um gás (JARDIM et al., 2006; BRUNNER, 2010).

O princípio de extração por fluido supercrítico aproveita as propriedades físicas dos fluidos no estado supercrítico. Acima do ponto crítico, algumas propriedades são intermediárias entre um gás e um líquido, como a densidade e a viscosidade. O fluido adquire uma densidade similar à de um líquido (portanto um poder de solvatação) e simultaneamente uma compressibilidade parecida com a de um gás (STUART et al., 1996). Por conta

da semelhança entre a viscosidade dos fluidos supercríticos e dos gases e por seu coeficiente de difusão ser maior que as dos líquidos, a extração das substâncias, mediante este processo, é facilitada.

Adicionalmente, o fluido em condições supercríticas possui um maior poder de solvatação que ocasiona uma alta permeação do fluido na amostra, aumentando a probabilidade de uma extração completa. A elevada taxa de transferência de massa dos solutos no fluido no estado supercrítico, considerando maior difusividade, menor viscosidade e menor tensão superficial em relação ao solvente líquido, faz dos fluidos supercríticos um meio de processamento adequado para técnicas de extração (QUEIROZ et al., 2001; RAVENTÓS et al., 2002; PEDERSSETTI et al., 2010; CORSO et al., 2010).

Na Tabela 2.1 apresenta-se uma comparação entre os valores típicos para densidade, viscosidade e difusividade de gases, líquido e fluidos supercríticos.

Tabela 2.1. Ordens de magnitude de parâmetros físicos para gases, líquidos e fluidos supercríticos

Estado do fluido	**Gás**	**Líquido**	**Fluido Supercrítico**	
	P = 0, 1013 MPa, T = 15 – 30ºC	P = 0, 1013 MPa, T = 15 – 30ºC	$P = P_c$, $T \approx T_c$	$P = P_c$, $T \approx T_c$
Densidade (g/cm^3)	$(0,6 – 2,0) \times 10^{-3}$	0,6 – 1,6	0,2 – 0,5	0,4 – 0,9
Difusividade (cm^2/s)	0,1 – 0,4	$(0,2 – 2,0) \times 10^{-5}$	$0,7 \times 10^{-3}$	$0,2 \times 10^{-3}$
Viscosidade (g/cm.s)	$(0,6 – 2,0) \times 10^{-4}$	$(0,2 – 3,0) \times 10^{-2}$	$(1 – 3) \times 10^{-4}$	$(3 – 9) \times 10^{-4}$

Fonte: Brunner, 2005.

De acordo com Peixoto (2008), ocorre um rápido e significativo aumento na densidade da substância somente acima da sua temperatura crítica. Entretanto, para elevados valores de temperatura reduzida, é necessária uma variação considerável de pressão para que se produza mudança substancial na densidade. E, como das propriedades de transporte, a densidade é o principal parâmetro de interesse nos processos de separação, é interessante selecionar temperaturas e pressões apropriadas para que os processos de extração não sejam realizados empiricamente.

A região crítica é conhecida como uma região de uma única fase e esta possui ambas as propriedades: a de líquido (solvatação) e a de gás

(difusividade). As motivações para o desenvolvimento da tecnologia de extração supercrítica residem nos seguintes fatos (TAYLOR, 1996):

i. Aumento acentuado no custo de energia, o qual elevou os custos das técnicas tradicionais de separação.
ii. Maior controle e regulamentação governamental dos solventes industriais comuns, pois a utilização do CO_2 supercrítico é aceitável ambientalmente e é uma alternativa para solventes orgânicos.
iii. Legislações de controle de poluição mais severas.
iv. Aumento das exigências do desempenho dos processos de separação.

O dióxido de carbono é comumente usado para a extração a partir de fluido supercrítico, principalmente devido às suas propriedades físicas e químicas, tais como pressão (73,82 bar) e temperatura crítica baixa (31 °C) (SEÑORÁNS; IBAÑEZ, 2002; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Além disso, apresenta vantagens em relação aos solventes orgânicos, pois apresenta características de gás e líquido, e não tem a necessidade de etapas posteriores para a remoção do solvente (BRUNNER, 2005; CORSO et al., 2010; HUISDEN et al., 2010).

No processo de extração supercrítica em matrizes sólidas, o fluido supercrítico escoa através do leito fixo (de partículas sólidas) e solubiliza os compostos existentes na matriz, sendo o solvente alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Durante a extração, a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura da célula, promovendo uma diminuição na resistência à transferência de massa. Os compostos extraíveis são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para a superfície externa da matriz e, em seguida, transportados pelo fluido, estes compostos podem mudar seu estado de agregação. Os compostos assim extraídos são removidos do extrator pelo escoamento do solvente (BRUNNER, 1994). Um esquema representativo de um extrator de leito fixo está representado na Figura 2.2.

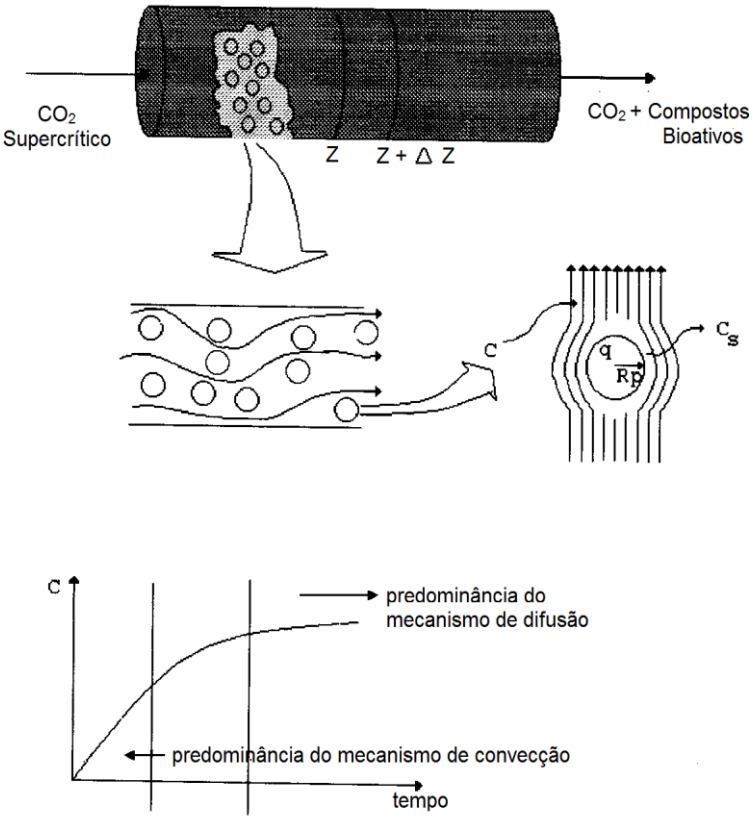


Figura 2.2. Esquema representativo de um extrator de leito fixo e dos mecanismos de transporte de massa proposto pelo modelo de difusão em sólido homogêneo. Fonte: Cardozo-Filho, 1999.

Na maioria dos casos, o substrato sólido forma um leito fixo. O fluido supercrítico atravessa o leito fixo e extrai os componentes do produto com os quais tem mais afinidade, até o esgotamento do substrato. A concentração dos compostos extraídos aumenta na direção do fluxo no fluido supercrítico e no material sólido. A forma da curva de concentração depende dos parâmetros da cinética de extração do sólido e do poder de solvatação do solvente que, por sua vez, depende das condições de operação. Tanto para o sólido quanto para o solvente, a extração é um processo não-estacionário (BRUNNER, 2005).

2.6. Modelagem matemática do processo de extração de óleos vegetais

A modelagem termodinâmica consiste em usar uma equação de estado com regra de mistura apropriada para calcular a fugacidade dos componentes no equilíbrio e com isso descrever o comportamento da solubilidade dos componentes puros e predizer o comportamento da solubilidade da mistura

multicomponente, a qual será composta pelos principais componentes do extrato, aqueles em maior concentração, visando a representar o comportamento da solubilidade do extrato como um todo.

Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, que posteriormente poderão ser aplicados a novas condições de trabalho e/ou outros materiais diferentes daqueles inicialmente pesquisados (RUIZ, 1999). De acordo com Reverchon (1997), o estudo da EFS de óleos essenciais pode ser dividido em três partes: a caracterização química dos extratos, a avaliação da influência dos parâmetros de processo e a modelagem matemática.

A modelagem matemática de características do processo de EFS é necessária para melhor compreensão do fenômeno, além de interpolar ou extrapolar condições experimentais. Modelos matemáticos permitem uma análise do processo e a previsão do que acontece em condições diferentes daquelas experimentadas, dentro de faixas delimitadas pelo modelo, e pela qualidade e quantidade de dados experimentais utilizados no ajuste de parâmetros.

Segundo Reverchon e De Marco (2006), os modelos matemáticos apresentados na literatura para representar as curvas de extração supercrítica podem ser classificados em três grupos: modelos empíricos, modelos baseados na analogia entre a transferência de massa e calor e modelos baseados na integração do balanço de massa.

O modelo de Sovová (1994) considera a EFS dividida entre três etapas: na primeira etapa há o óleo de fácil acesso (óleo exposto ou óleo livre), onde a resistência à transferência de massa se encontra na fase de solvente; na segunda etapa, o óleo fácil acesso é esgotado no início do extrator e inicia o processo difusivo (extração do óleo de difícil acesso, do interior das partículas sólidas); e na terceira etapa ocorre o processo difusivo (esgotamento do óleo livre em toda a extensão do leito).

Segundo Reverchon (1997), diferentes modelos têm sido propostos para descrever as principais características da EFS de óleos essências. No entanto a validade deles varia de acordo com a estrutura do material vegetal utilizado. Além disso, a composição dos extratos obtidos no processo da EFS varia com a pressão e a temperatura de extração, sendo necessária uma

otimização preliminar das condições de extração. Ainda são requeridas informações das partículas e outros. Por isso, os mecanismos de extração postulados nos modelos devem corresponder à estrutura do material vegetal.

A modelagem matemática da extração por fluido supercrítico de produto com alto valor agregado de matrizes vegetais, como ervas, sementes, folhas ou cascas, é difícil devido à existência de estruturas diferentes no material. O material vegetal é geralmente triturado, antes do processo de extração, para aumentar a área de contato com o solvente supercrítico e também para aumentar a acessibilidade ao soluto presente no interior da estrutura celular, aumentando, assim, a cinética de transferência de massa. Isso permite descrever as partículas resultantes, utilizando geometrias básicas, como cilindro ou esfera. Algumas simplificações acerca de como o soluto está distribuído no interior do sólido (adsorvido na rede de poros, amarrado dentro das estruturas celulares ou homogeneamente distribuído no interior da partícula) e sobre o mecanismo envolvido na cinética de transferência de massa (resistência interna de transferência de massa, resistência externa de transferência de massa ou a combinação de várias resistências), são necessárias para reduzir a complexidade do modelo matemático (OLIVEIRA et al., 2011).

Há vários modelos empregados para descrever a EFS de óleos ou outros componentes de materiais vegetais. Todos eles consideram que as partículas estão empacotadas dentro da coluna do extrator. As simplificações empregadas pela maioria dos autores são que a operação é isotérmica, a queda de pressão no interior do extrator é desprezível e a porosidade do leito e a densidade do sólido são constantes durante a extração. Além isso, é usual assumir que a densidade e a velocidade do fluido e a dispersão axial permanecem quase constantes, pois o escoamento do soluto no fluido supercrítico é baixo. Contudo, vários autores têm considerado a dispersão axial negligenciável. Essas suposições reduzem o número de equações necessárias usadas no balanço de massa, relações de equilíbrio e leis cinéticas para descrever o processo de extração (Mc HUGH e KRUKONIS, 1986).

Na literatura, podemos encontrar a descrição de alguns modelos usados para descrever as cinéticas de ESC. Modelos como os de Crank (1975), Tan e Liou (1989), Goto et al. (1993), Sovová (1994), Esquível et al.

(1999a) e Martinez et al. (2003), entre outros, são geralmente utilizados. Na Tabela 2.2 podemos encontrar as considerações acerca de alguns modelos matemáticos baseados na transferência de massa.

Os modelos difusivos requerem que sejam conhecidas a geometria da fase sólida e a porosidade da matriz sólida. Além disso, para estes modelos, o esforço computacional para a resolução das equações é grande, em virtude da necessidade de se determinar o perfil de concentração do composto a ser extraído na partícula.

Outros autores têm preferido usar modelos empíricos, os quais se tornam possíveis após várias simplificações e apresentam solução analítica. Dentre estes, destacam-se Tan e Liou (1989), que consideram a cinética de extração como sendo de primeira ordem em relação às concentrações do óleo no sólido; Souza et al. (2008), consideram a cinética de extração como sendo de segunda ordem e os compostos bioativos a serem extraídos como pseudocomponentes.

Os modelos empíricos de cinética de extração não consideram a variação da concentração do composto no interior da partícula (modelos de parâmetros concentrados). Portanto, o esforço computacional é reduzido, pois a concentração desta substância na matriz sólida depende apenas da posição das partículas no interior do leito e do tempo.

Considerando a grande importância que tem sido atribuída aos processos de extração por fluidos supercríticos, optou-se em determinar os parâmetros de transferência de massa mais relevantes via modelagem matemática empírica de segunda ordem do processo na extração do óleo das sementes de *Mucuna.*

Tabela 2.2. Modelos matemáticos baseados na transferência de massa para EFS de produtos naturais

REFERÊNCIA	MODELO	CONSIDERAÇÕES
Glueckauf e Coates (1947)	Força motriz linear, considerando partícula sólida esférica.	Fluxo de transferência de massa é proporcional à diferença entre a média da concentração do soluto na partícula e a concentração do soluto em equilíbrio com a fase fluida.
Crank (1975)	Modelo de difusão	Modelo de transferência de massa desenvolvido como uma analogia da transferência de calor em partícula esférica. A segunda lei de Fick foi aplicada para a difusão na modelagem.
Recasens et al. (1989)	Força motriz linear, considerando partícula sólida porosa.	Fluxo de transferência de massa, onde duas aproximações da força motriz linear são empregadas, uma entre a fase fluida e o fluido nos poros do sólido e a outra entre a fase fluida nos poros e a fase sólida.
Tan e Liou (1989)	Modelo empírico	Transferência de massa definida com a cinética de extração de primeira ordem, negligenciando a dispersão axial e a difusão intrapartícula.
Goto et al. (1993)	Placa simples e porosa	A extração ocorre com o efeito da dessorção e diferenciação da concentração do soluto no interior da partícula a partir da concentração nos poros.
Sovová (1994)	Células intactas e células quebradas	O pré-tratamento resulta em partículas com células intactas e quebradas. A cinética de extração de células quebradas é mais rápida do que de células intactas. O mecanismo de transferência de massa em células quebradas é a convecção, enquanto para células intactas é a difusão molecular.
Goto et al. (1996)	Modelo de encolhimento de núcleo.	Existência de uma nítida fronteira entre as partes extraídas e não extraídas da partícula. Todo o soluto deixa a partícula por convecção. Toma a difusividade efetiva como parâmetro.
Reverchon e Marrone (1997)	Modelo de difusão	O fenômeno de transferência de massa é proposto para ser similar àquele descrito com um único pseudocomponente. Não há resistência interna. Relação de equilíbrio linear. A dispersão axial e a resistência externa foram avaliadas.

Tabela 2.2. Cont.

Perrut et al. (1997)	Partículas porosas	O fenômeno de transferência de massa é proposto para ser similar àquele descrito com um único pseudocomponente. O fenômeno de difusão dentro da partícula e o mecanismo de fluido-dinâmica de transferência de massa fora da partícula são considerados.
Esquível et al. (1999)	O modelo empírico	Caracterizado para ser um modelo muito simples, com somente um parâmetro ajustável.
Reverchon e Marrone (2001)	Células intactas e células quebradas	Mecanismo de resistência em paralelo, no qual tanto as células quebradas quanto as células intactas transferem soluto para o fluido com uma cinética diferente.
Martinez et al. (2003)	Modelo logístico	O extrato é uma mistura de compostos ou grupo de compostos com estrutura química similar. Neste modelo, o termo de transferência de massa interfacial foi descrito como uma função logística com dependência com a composição do extrato durante o processo.
Sovová (2005)	Células intactas e células quebradas	O soluto de células quebradas difunde-se diretamente para a fase fluida, enquanto o soluto de células intactas difunde-se apenas para as células quebradas, o que configura um modelo de resistência em série, portanto são desenvolvidos dois balanços materiais.
Fiori et al. (2009)	Células intactas e células quebradas e encolhimento do núcleo	O decréscimo do pseudocoeficiente de transferência de massa é proporcional à distância da superfície das partículas. Três abordagens são propostas para calcular o valor do pseudocoeficiente de transferência de massa: (a) empregar uma função contínua em todas as partículas para calcular a dependência do coeficiente com o raio do núcleo – modelo contínuo; (b) usar um pseudocoeficiente constante até que a primeira camada esteja esgotada e então usar uma função contínua do raio do núcleo – modelo semi-contínuo; (c) usar uma valo constante do coeficiente para cada camada – modelo discreto.

2.7. Considerações em relação ao estado da arte

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se relatar o estado da arte a respeito das sementes de *Mucuna,* sendo a mesma constituída por diversas substâncias, entre estas a L-Dopa, um importante composto químico que exerce influências alélopaticas em algumas culturas, como a inibição do crescimento de plantas daninhas.Há também relatos na literatura da sua utilização para o tratamento da doença de Parkinson e como agente antioxidante.

Com a finalidade de concentrar a L-Dopa, tema alvo deste trabalho, foi realizada a extração do óleo a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas, diclorometano e hexano. A extração de óleos vegetais utilizando um solvente em condições supercríticas apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais, devido às características dos solventes em determinadas condições de pressão e temperatura, o qual proporciona maior seletividade no processo de extração de alguns compostos. Constata-se, ainda, que a substituição de solventes orgânicos pelos solventes em condições supercríticas não geram resíduos, sendo um grande passo em termos de gerenciamento ambiental. E como a L-Dopa apresenta uma baixa solubilidade em dióxido de carbono supercrítico, a remoção do óleo das sementes de *Mucuna* poderá ser uma técnica eficiente para concentrar o composto no farelo desengordurado.

Durante o período do desenvolvimento do presente trabalho não foi encontrado, nos bancos de dados da literatura pesquisados, estudos que busquem concentrar o composto L-Dopa, utilizando dióxido de carbono. Tal fato despertou o interesse e motivação para a realização da presente investigação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os procedimentos adotados visando à extração e caracterização do óleo das sementes *Mucuna* das variedades *Mucuna aterrima*, *Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, utilizando dióxido de carbono supercrítico e solventes orgânicos. Apresenta-se, ainda, as metodologias utilizadas na quantificação do composto L-Dopa no farelo desengordurado, bem como a avaliação da atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e testes de germinação de sementes com a aplicação do mesmo.

3.1. Materiais

Foram utilizadas sementes de *Mucuna* de três variedades: *Mucuna aterrima*, *Mucuna* cinerium e *Mucuna deeringiana*, cultivadas e fornecidas pela empresa “Pró sementes” (Rio de Janeiro, Brasil) em novembro de 2010. Para a extração do óleo, os solventes utilizados foram: dióxido de carbono (99,5 % de pureza), procedente da White Martins; para a extração convencional foi utilizado (Soxhlet) diclorometano e hexano (99,6 % de pureza), ambos de procedência Merk.

Nas análises qualitativas e quantitativas dos extratos obtidos, foram utilizados como derivatizantes trifluoreto de boro (99,5 %) (BF_3) e bis (trimethylsilyl) trifluoro acetamide (BSTFA); como padrão interno, metil heptadecanoato, ambos obtidos da empresa Sigma Aldrich. Como solvente, foi utilizado o heptano (99,6 % de pureza) Merck.

Nas análises do farelo desengordurado, utilizou-se o padrão L - 3,4-Dihidroxifenilalanina (Sigma-Aldrich), metanol e ácido fosfórico, ambos com grau HPLC (Tedia) para quantificação do teor de L-Dopa. Para a determinação da atividade antioxidante, utilizou-se o DPPH (1,1-difenil-2-pirilhidrazina), de procedência Sigma Aldrich, água ultrapura, metanol (99,6 % de pureza) (FMAIA) e butil-hidroxitolueno (BHT), grau analítico. O teor de compostos fenólicos foi determinado utilizando-se o reagente Folin-Denis (Sigma Aldrich). Para a construção da curva de calibração, foi utilizado Ácido gálico (99% de pureza), Vetec.

Para a realização dos testes de germinação, foram utilizadas sementes de soja variedade BRS 282, safra 2009/2010, obtidas da empresa SL Alimentos (Paraná), caixas plásticas (Gerbox) e folhas de papel filtro (Germitex).

3.2. Caracterização e preparo da matéria-prima

3.2.1. Moagem e granulometria do material

As sementes foram trituradas em um moinho elétrico (IKA, modelo A 11/B) na velocidade de 14000 rpm, utilizando peneiras do tipo Tyler para a classificação granulométrica das amostras, com o auxílio de um agitador mecânico de peneiras (Bertel, série 1.0). Sendo obtidas amostras com diâmetro médio de 1,18 mm e 0,6 mm para condução dos experimentos.

3.3. Extração do óleo das sementes de Mucuna

3.3.1. Extração com solvente orgânico

A extração do óleo por solvente orgânico foi realizada conforme recomendado por Instituto Adolfo Lutz (2004). Na extração com solvente orgânico, utilizou-se um aparelho Soxhlet (500 mL), onde foram adicionados separadamente cerca de 30 g das sementes em cartuchos de papel filtro, amarrados com fios de poliéster, e 300 mL de solvente (diclorometano ou hexano). Os solventes orgânicos foram escolhidos devido às diferenças de suas polaridades e constantes dielétricas, sendo o diclorometano um solvente polar e o hexano um solvente apolar.

O sistema foi mantido em refluxo durante 8 horas. Evaporou-se o excesso de solvente em rota evaporador (IKA, RV10) e o remanescente em estufa (Nova Ética 400 / 4ND) até peso constante a 40 °C para as extrações realizadas com diclorometano e a 69 °C para as extrações realizadas com hexano. As sementes que se encontravam no cartucho foram secas em estufa (Nova Ética 400 / 4ND) a 30 °C e armazenadas em frasco âmbar para posterior análise.

3.3.2. Extração por fluido supercrítico

Para a extração com dióxido de carbono em condições pressurizadas, utilizou-se aparato experimental disponível no Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Equilibro de Fases da Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Engenharia Química).

A unidade experimental é constituída basicamente de um cilindro de dióxido de carbono, dois banhos termostáticos, duas bombas tipo seringa, um vaso extrator encamisado de aço inox, com capacidade de 166,5 mL, um transdutor absoluto de pressão equipado com um programador portátil e um vaso coletor. Cerca de 60 g de sementes secas foram introduzidas no extrator. Em seguida, o solvente foi bombeado e mantido em contato com a matriz herbácea por pelo menos 30 minutos para permitir a estabilização do sistema. O óleo foi coletado a partir da abertura da válvula macrométrica e micrométrica. Depois disso, a massa de óleo extraída foi pesada e o tubo foi reconectado ao equipamento. Este procedimento foi realizado até que a massa de óleo extraída mantivesse constante. A Figura 3.1 apresenta o aparato experimental utilizado nas extrações.

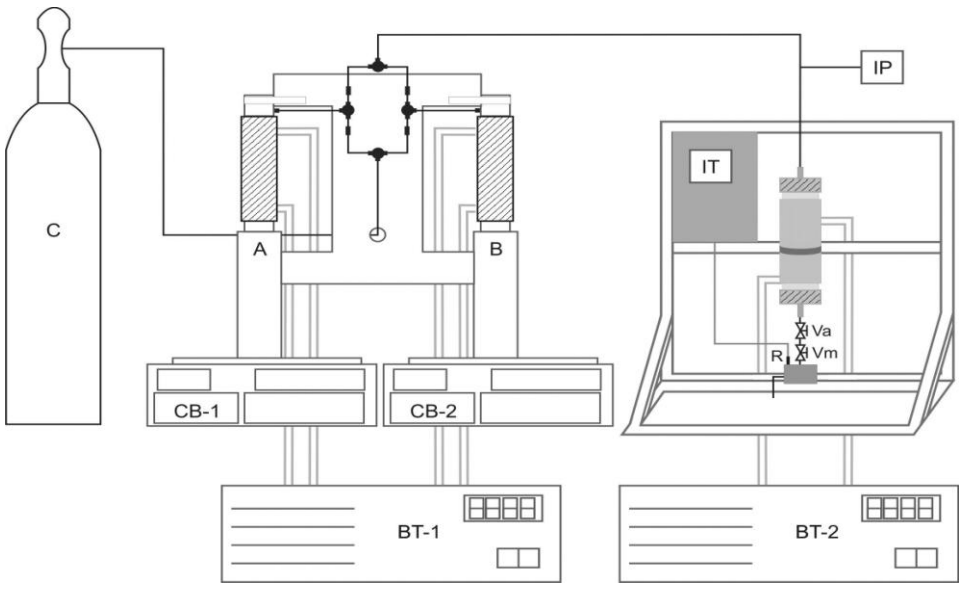


Figura 3.1. Aparato experimental utilizado nas extrações por fluido supercrítico. (C) Cilindro de gás; (A) e (B) Bomba tipo seringa; (CB-1) e (CB-2) Controlador das bombas; (BT-1) Banho termostatizado das bombas; (BT-2) Banho termostatizado do extrator; (IT) Indicador de temperatura; (IP) Indicador de pressão; (Va) Válvula agulha; (Vm) Válvula micrométrica; (R1) Reservatório de coleta do óleo.

C1 (Cilindro de gás, Air Liquide, 25 kg): armazena o solvente utilizado nas extrações **.**

CB-1 (A e B) (Bomba de alta pressão do tipo seringa, Teledyne, modelo ISCO 500 D): utilizada para alimentação do solvente (CO_2) no extrator.

BT (1 e 2) (Banho termostáticos, Tecnal, Modelo TE – 184): utilizado para controlar a temperatura das bombas tipo seringa encamisadas.

IT (Indicador de temperatura digital, COEL, Modelo HW4200): utilizado para monitorar a temperatura do reservatório de coleta.

IP (Manômetro, WIKA, Modelo 213.53): indica a pressão no vaso extrator.

Va / Vm (Válvula agulha e micrométrica, Autoclave Engineers, 10v2071, ERIE PA): utilizadas para controlar o fluxo do solvente.

R1 (Reservatório de Coleta): local onde o óleo é coletado.

A vista geral do aparato experimental utilizado nas extrações é apresentado na Figura 3.2.

...

Figura 3.2. Vista geral do aparato experimental utilizado nas extrações por fluido supercrítico. (C) Cilindro de gás; (A) e (B) Bomba tipo seringa; (CB-1) e (CB-2) Controlador das bombas; (BT-1) Banho termostatizado das bombas; (BT-2) Banho termostatizado do extrator; (IT) Indicador de temperatura; (IP) Indicador de pressão; (Va) Válvula agulha; (Vm) Válvula micrométrica; (R1) Reservatório de coleta do óleo.

3.4. Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares com a fim de verificar o tamanho da partícula que apresentava o maior rendimento em óleo. As condições selecionadas para estes testes foram: pressão de 244,1 bar e 250 bar, temperatura de 60 °C e 40 °C, sendo avaliado a cinética e o rendimento global nestas condições.

3.4.1. Experimentos

As extrações com solvente pressurizado foram realizadas nas condições descritas na Tabela 3.1 com fluxo de solvente fixo em 3 mL min^{-1} e coleta da amostra de 10 em 10 minutos e após duas horas de extração de 20 em 20 minutos. O rendimento de extração foi calculado pela razão entre a massa de óleo extraído e da matéria prima utilizada. A densidade do solvente foi determinada de acordo com Angus (1976).

Tabela 3.1. Condições experimentais empregadas para a extração do óleo das sementes de *Mucuna* a partir de dióxido de carbono supercrítico.

Condições		
Pressão (bar)	**Temperatura (°C)**	**Densidade (g mL^{-1})**
150,0	40	0,78
176,7	60	0,68
244,1	60	0,78
250,0	40	0,88

3.5. Análises do farelo desengordurado

Para a determinação do percentual de L-Dopa, atividade antioxidante e compostos fenólicos, presentes nas sementes de *Mucuna,* os testes foram realizados com o farelo desengordurado, obtidos por extração, utilizando dióxido de carbono supercrítico, e pelo método clássico de extração com solventes orgânicos (diclorometano e hexano).

3.5.1. Extração da L-Dopa

Para realização das análises do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna,* realizou-se a pesagem de 0,1 g do farelo desengordurado de *Mucuna*, adicionou-se 5 mL de água ultra pura e foi levado ao sonicador (Unique 1400A) por 5 min. Este procedimento foi repetido para a análise quantitativa do teor de L-Dopa, determinação da atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos.

3.5.2. Análise quantitativa do teor de L-Dopa

A quantificação do teor de L-Dopa foi realizado por meio de um Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian 920 LC, com detector ultravioleta-visível, equipado com bomba quaternária e injetor automático. A análise foi realizada utilizando coluna Res Elut C_{18} (Varian, 150 mm x 4,6 mm d. i.) em temperatura de 30 °C, sendo a fase móvel constituída de água, metanol e ácido fosfórico (97,5:2:0,1 v/v/v), fluxo de 0,5 mL min^{-1}, detecção em 280 nm e injeção de 20 µL de amostra (BEZERRA et al., 2003). Utilizou-se o padrão cromatográfico L-3,4-Dihidroxifenilalanina, para a obtenção da curva de calibração, com injeção de soluções com concentrações crescentes de L-Dopa (5 a 140 mg L^{-1}), o qual apresentou um coeficiente de regressão de 0,99, conforme apresentado na Figura 3.3. Os cromatogramas das amostras utilizadas para obtenção da curva de calibração são apresentados no apêndice A.

Após o processo de extração da L-Dopa, descrito no item 3.5.1, as amostras foram filtradas em membrana de nylon 0.45 µm (Milipore) e 50 µL desta solução foram transferidos para balão volumétrico de 1 mL e o volume completado com a fase móvel (água, metanol e ácido fosfórico). Todas as análises foram realizadas em duplicada.

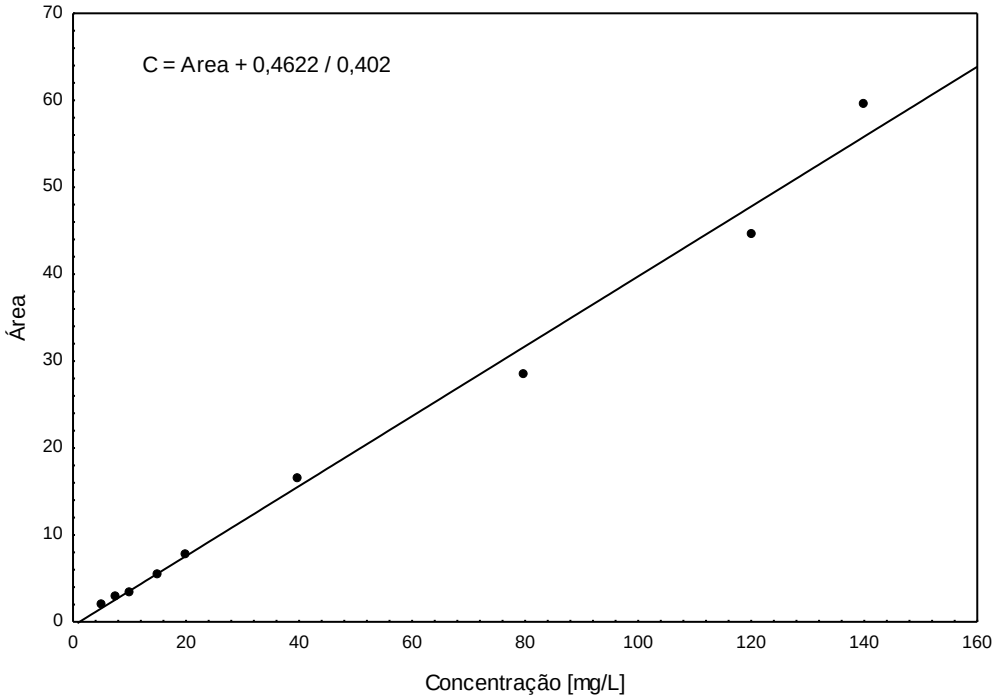


Figura 3.3. Curva de calibração do padrão L-3,4-Dihidroxifenilalanina para quantificação do teor de L-Dopa presente nas sementes de *Mucuna,* obtida por cromatografia liquida de alta eficiência.

3.5.3. Atividade antioxidante (DPPH)

O método de DPPH é baseado na metodologia de Brand-Willians et al. (1995), utilizando o radical estável DPPH que sofre redução pelos antioxidantes com mudança na coloração violeta para amarela, proporcional à concentração de substâncias redutora da amostra.

Preparou-se uma solução estoque com 0,024 g do reagente DPPH diluídas em 100 mL de metanol, que foi mantida sob refrigeração até a sua utilização. Retirou-se 10 mL da solução estoque e adicionou-se 45 mL de metanol para preparar a solução trabalho que foi utilizada para a reação do DPPH com o farelo desengordurado. Leu-se a absorbância desta solução a 517 nm em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1203.

O processo de extração dos compostos com atividade antioxidante foi realizado de acordo com a seção 3.5.1. A cada teste eram adicionadas 20 μL, 30 μL, 40 μL, 50 μL, 70 μL, 100 μL e 150 μL da amostra e completado com a solução trabalho para preencher o volume final de 3,0 mL, com o objetivo de

obter concentrações de 13,33 a 100 μg mL^{-1}. Para o controle negativo, 150 μL de água destilada eram adicionados em 2.750 μL de solução trabalho e, para o controle positivo, realizado apenas para verificar a eficiência da solução trabalho, 150 μL de butil-hidroxitolueno (BHT) foi adicionado em 2.750 μL de solução trabalho. Deixou-se reagir por 1 hora no escuro em temperatura ambiente e leram-se as absorbâncias a 517 nm. O cálculo do percentual de atividade antioxidante (AA) foi realizado de acordo com a equação 3.1.

$$AA\% = \left(\frac{1 - Abs_{amostra}}{Abs_{controle\ \ negativo}}\right) x100 \qquad (3.1)$$

Onde: $AA\%$ - Percentual de atividade antioxidante; $Abs_{amostra}$ - Valor da absorbância da amostra e $Abs_{controlenegativo}$ - Valor da absorbância do controle negativo.

A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a o valor da C_E50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007).

3.5.4. Compostos fenólicos

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, o método descrito por MEDA et al. (2005) foi empregado, porém utilizando-se o reagente de Folin-Denis em vez do reagente de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI, 1965). O reagente Folin-Denis, embora não específico para uma determinada classe de metabólitos, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma matriz. Desta forma, pode-se utilizar esta metodologia para a quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolíbdico e tungístico do reagente Folin-Denis (FERREIRA et al., 2004).

O processo de extração dos compostos foi realizado de acordo com a seção 3.5.1. Em uma alíquota de 50 μL dessa solução, adicionou-se 450 μL de água ultra pura e, logo em seguida, adicionou-se 2,5 mL de solução contendo o reagente Folin-Denis 10 %. Após 5 minutos, adicionou-se 2,0 mL de solução recém preparada de carbonato de sódio 14. Manteve-se a mistura incubada no escuro por 2 horas e a coloração da solução passou de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a medida de sua absorbância a 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1203). Como branco realizou-se o mesmo procedimento, porém com água ultrapura ao invés de soluções de *Mucuna*. O teor de compostos fenólicos foi quantificado por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico, conforme é apresentado na Figura 3.4, em concentrações de 0,8 a 7 μg mL^{-1} e expressos como g de EAG (equivalente de ácido gálico). O qual apresentou um coeficiente de regressão de 0,99.

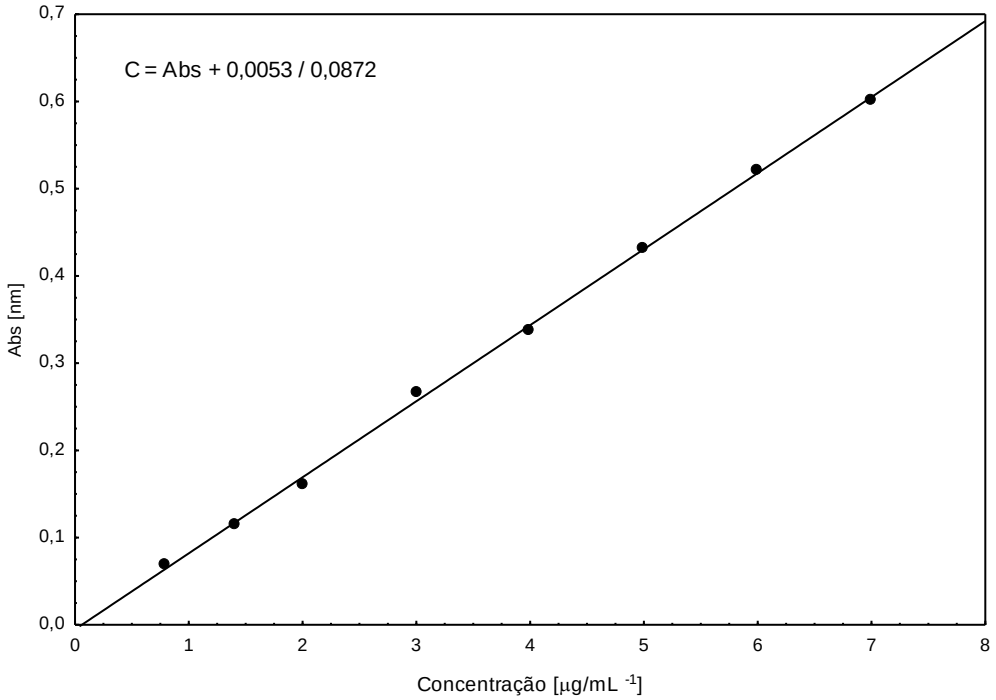


Figura 3.4. Curva de calibração do padrão de ácido gálico obtida para a determinação do teor de compostos fenólicos totais.

3.5.5. Testes de germinação em sementes de soja

Para os ensaios de germinação, utilizou-se 100 sementes de soja (*Glycine Max L. Merril*), em cada tratamento, sendo divididas em 4 repetições de 25 sementes cada. As sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a

2% (v/v) por 5 min e lavadas exaustivamente com água deionizada. O Tratamento controle (TC) foi realizado apenas com água deionizada e para os demais tratamentos o processo de extração dos compostos foi realizado de acordo com a seção 3.5.1.

O ensaio germinativo foi conduzido em caixas plásticas, tipo gerbox (11x11x3,5cm) transparente, com tampa (contendo 3 folhas de papel filtro), onde as sementes de soja foram semeadas, após embebidas na solução de L-Dopa, sendo mantidas em câmara de germinação, com fotoperíodo de 12 horas para luz e 12 horas para escuro, a 22 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 85%. Avaliou-se diariamente a porcentagem de germinação, conforme descrito por Feo et al. (2002) e Adegas et al. (2003), e, ao final do ensaio, foi avaliado o índice de velocidade de germinação (IVG), utilizando a expressão proposta por Maguire (1962).

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} \ldots \frac{G_n}{N_n} \quad (3.2)$$

Em que:

G_1, G_2 e G_n representam o número de sementes normais germinadas até o enésimo dia.

N_1, N_2 e N_n representam o número de dias em que se avaliaram as germinações G_1, G_2 e G_n.

O experimento foi conduzido durante 7 (sete) dias, em um delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e Testes de Médias de Tukey ao nível de significância de 5% ($p>0,05$).

3.6. Análise do óleo das sementes de *Mucuna*

Para a determinação do teor de ácidos graxos totais e dos compostos livres de glicerol presentes no óleo das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono supercrítico, diclorometano e hexano, as análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás, marca Agilent 7890 A, acoplado ao espectro de massas MS 8990.

3.6.1. Análise dos ácidos graxos totais

A análise dos ácidos graxos totais presentes no óleo das sementes de *Mucuna* foi realizada utilizando-se uma coluna capilar (ZBWAX, 30m x 0,25mm x 0,25 µm) programada a uma temperatura inicial de 120 °C, aumentando para 180 °C, a uma taxa de 15 °C min^{-1}, e para 240 °C, a 5 °C min^{-1}, permanecendo nesta temperatura durante 5 minutos. A vazão do gás de arraste foi de 1,5 mL/min. As análises foram realizadas com a temperatura do injetor a 250 °C e detector a 250 °C, utilizando um volume de injeção de 1 µL, no modo split 1:50. Com a finalidade de determinar os ácidos graxos totais presentes nas amostras de óleo extraídas por cromatografia gasosa, foi realizada a derivatização do óleo com solução metanólica de BF_3 seguindo a metodologia padrão AOAC Ce 2-66 (1990). A identificação dos componentes presentes no óleo das sementes de *Mucuna* foi realizada por comparação dos dados do espectro com os apresentados na biblioteca Willey. Para a quantificação dos ácidos graxos totais, heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno. A análise de variância dos dados foi realizada utilizando o software SAS 9.1.3 (SAS Institute).

3.6.2. Análise dos compostos livres de glicerol

Os compostos livres de glicerol presentes no óleo das sementes de *Mucuna* foram convertidos com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) em piridina volátil, como relatado por Freitas et al. (2008). Aproximadamente 20 mg de óleo foram derivatizadas com 20 µL de BSTFA. A solução foi agitada e permaneceu durante 30 minutos em temperatura ambiente. As análises foram realizadas com uma coluna capilar DB 5 (30m x 0.25mm x 0.25 µm). As condições foram: injeção split 1:10, temperatura da coluna: 200 ºC, mantido nesta temperatura por 8 min, programada até 235 ºC numa taxa de 3 °C min^{-1}, a uma taxa de 15 °C min^{-1} foi elevada até 280 °C e mantida nesta temperatura por 15 minutos; gás de arraste: hélio, a 1,5 mL min^{-1}; temperatura do injetor e detector 280 °C, volume de injeção de 2 µL, no modo split 1:10. A identificação dos componentes presentes no óleo das sementes de *Mucuna* foi realizada por comparação dos

dados do espectro com os apresentados na biblioteca Willey. Para a quantificação dos compostos livres de glicerol, heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno.

3.7. Modelagem matemática

A modelagem matemática proposta tem como objetivo geral calcular os parâmetros de transferência de massa relevante ao processo de extração supercrítica conduzida em escala laboratorial. Considerou-se que esses parâmetros (densidade aparente do leito, solubilidade, constante cinética, e etc.) determinam o processo de extração supercrítica e são altamente correlacionáveis em pequena e grande escala (MEIRELES, 2009).

As curvas cinéticas de extração usando CO_2 supercrítico do óleo das sementes de *Mucuna* foram modeladas utilizando um modelo empírico de segunda ordem que não requer conhecimento do perfil axial de concentração da espécie química desejada ao longo de todo o leito de extração. Investigações prévias demonstram sucesso na modelagem da cinética de extração supercrítica utilizando esse tipo de modelo (SOUZA et al., 2008).

O modelo matemático assume as seguintes hipóteses:

i. O processo é isotérmico e isobárico.
ii. A dispersão axial dentro do extrator é negligenciável.
iii. No início do processo o sistema está em equilíbrio.
iv. Os compostos bioativos são tratados como pseudocomponente.
v. O modelo é unidimensional e somente a coordenada do escoamento é considerada.

A equação do balanço de massa para os compostos bioativos na fase fluida resulta na seguinte equação diferencial:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\rho_{leito}}{\varepsilon}\frac{\partial q}{\partial t} + u\frac{\partial C}{\partial z} = 0 \qquad (3.3)$$

Na qual C é a concentração dos compostos bioativos no solvente (g mL^{-1}); q é a concentração dos compostos bioativos na matriz sólida ($g_{C.B./}g_{sólido}$); ρ_{leito} é a densidade no leito (g mL^{-1}); u é a velocidade (cm min^{-1}); t é o tempo de extração (min); ε é a porosidade do leito; z é a coordenada na

direção axial do leito (cm). A equação (3.4) assume que a taxa de extração é proporcional ao produto da capacidade de extração da fase fluida $(C_{eq} - C)$ e a concentração dos compostos bioativos na matriz sólida q.

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -kq\left(C_{eq} - C\right) \tag{3.4}$$

Na qual k é a constante cinética $\left(\frac{cm^3}{g}\min\right)$; C_{eq} é a concentração de equilíbrio dos compostos bioativos no solvente $\left(\frac{g_{óleo}}{cm^3}\right)$.

As condições iniciais e de contorno são expressas pelas equações (3.5) e (3.6), respectivamente:

$$\begin{aligned} &C(0,z) = C_{eq} \\ &e \\ &q(0,z) = q_0 \end{aligned} \tag{3.5}$$

$$C(t,0) = \begin{cases} C_{eq} & t = 0 \\ 0 & t > 0 \end{cases} \tag{3.6}$$

Em que q_0 (g de óleo extraído/g de sólido inerte) é a quantidade dos compostos bioativos inicial concentrado na matriz sólida depois da pressurização do extrator.

A equação (3.7) representa a solução analítica para o modelo.

$$\frac{C}{C_{eq}} = \begin{cases} 1 & t < t_r \\ 1 - \dfrac{1}{(e^{A} + e^{-B} - 1)} & t > t_r \end{cases} \tag{3.7}$$

Em que $t_r = \left(\frac{L}{u}\right)$ é o tempo de residência; L é o comprimento da coluna (m); u é a velocidade (m/min), $A = \left(\frac{z}{u}\right)\beta$, $B = \left(\frac{-tu+z}{\alpha u}\right)\beta$, $\beta = kC_{eq}\alpha$ e $\alpha = \left(\frac{\rho_{leito} q_0}{\varepsilon C_{eq}}\right)$.

A massa dos compostos bioativos extraída como função do tempo foi calculada pela equação (3.8):

$$M_{óleo} = \int_0^{te} C\ Q_f\, dt$$

$$= \begin{cases} C_{eq} Q_f t & t < t_r \\ C_{eq} t Q_f - \dfrac{C_{eq} Q_f \alpha}{\beta} \ln\left(e^{\frac{z\beta}{u}} + e^{\frac{(-(tv+z)\beta)}{\alpha u}} \right) & t > t_r \end{cases} \quad (3.8)$$

Sendo que Q_f é o fluxo volumétrico de solvente; e C é a concentração dos compostos bioativos na fase fluida na saída do extrator. A constante k foi determinada correlacionando os dados experimentais das extrações supercríticas conduzidas neste trabalho. Utilizou-se a função objetivo definida pela equação (3.9) no procedimento de ajuste da constante k.

$$F = \sum_{j=1}^{n\exp} \left(m_{óleo_j}^{MOD} - m_{óleo_j}^{n\exp} \right)^2 \quad (3.9)$$

Nesta equação, $m_{óleoj}^{MOD}$ é massa calculada dos compostos bioativos extraídos, utilizando o modelo de transferência de massa; $m_{óleoj}^{n\exp}$ é a massa dos compostos bioativos obtida experimentalmente, e $n\exp$ é o número de dados experimentais da curva cinética. No cálculo do parâmetro do modelo foi utilizado o método numérico de otimização univariável da secção áurea, que foi implementado num programa computacional em Linguagem FORTRAN.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão relatados os rendimentos em óleo obtidos por métodos clássicos de extração, utilizando dois tipos de solventes: diclorometano e hexano. Serão relatados os rendimentos em óleo da extração realizada a partir do dióxido de carbono em condições supercríticas, o percentual de L-Dopa presente no farelo desengordurado, bem como a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos. A aplicação do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna deeringiana* em sementes de soja também é abordada. A partir do óleo obtido, determinou-se o teor de ácidos graxos totais e compostos livres de glicerol, para as três variedades estudadas neste trabalho (*Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*).

4.1. Extrações

4.1.1. Extrações com solventes orgânicos

Foram realizadas extrações com solvente orgânico (diclorometano e hexano), com o objetivo de comparar os resultados obtidos com a EFS. Os dados de rendimento de cada extração estão apresentados na Tabela 4.1. As extrações foram realizadas com o solvente em sua temperatura de ebulição, sendo para o diclorometano a 69 °C e para o hexano a 40 °C. Os resultados das extrações foram expressos em relação à massa da amostra inicial.

Tabela 4.1. Rendimento em óleo das sementes *Mucuna* obtido por extração com solvente orgânico (diclorometano e hexano).

	Rendimento (m/m)		
Solvente	***Mucuna aterrima***	***Mucuna cinerium***	***Mucuna deeringiana***
Diclorometano	5,23	5,22	6,85
Hexano	5,33	6,93	7,44

Na Tabela 4.1, podemos observar que o maior rendimento em óleo foi obtido utilizando hexano como solvente para as três variedades. O percentual de rendimento em óleo foi de 6,93 % e 7,44 %, para *Mucuna cinerium* e

Mucuna deeringiana, respectivamente. Na extração com diclorometano, os percentuais encontrados foram 5,23; 5,22 e 6,85 para *Mucuna aterrima*, *Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana,* respectivamente. O hexano possui viscosidade de 0,3 mPa e constante dielétrica 1,9, sendo considerado um solvente apolar, o que pode ter influenciado no processo de extração e, conseqüentemente, aumentado o rendimento, visto que, segundo Felipe et al. (2006), a extração do óleo é atribuída à polaridade do solvente.

De acordo com Manirakiza et al. (2001), a utilização do método de Soxhlet, usando diferentes solventes como éter de petróleo, metanol, n-hexano, diclorometano:hexano (1:4) e acetona:hexano (1:4), separadamente, em cada extração, foi conveniente para extração de óleo de amostras sólidas que continham alto teor de lipídios. As amostras extraídas com metanol, tanto por Soxhlet como por Bligh e Dyer, apresentaram um alto rendimento em óleo, uma vez que o metanol possui um poder de solvatação superior ao dos outros solventes usados.

4.1.2. Extração com dióxido de carbono supercrítico

4.1.2.1. Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares da extração do óleo das sementes de *Mucuna* para estabelecer uma metodologia operacional e o tamanho da partícula para extração e, assim permitir, um maior rendimento nos experimentos. A Figura 4.1 apresenta o rendimento em óleo de acordo com o tempo de extração, no qual o percentual de óleo extraído variou de 3,05 % a 4,58 %, da qual se pode observar que a condição que apresentou o melhor rendimento foi a condição com temperatura de 40 ºC e pressão de 250 bar (4,58 %). Verifica-se ainda que as maiores frações de rendimentos foram em condições de pressões mais elevadas, indicando ser este o parâmetro que influenciou nos rendimentos de óleo. Este efeito também foi constatado por HAMDMAN et al*.* (2008) e FREITAS et al. (2008).

Os resultados demonstraram que o tamanho da partícula de 0,6 mm fornece maiores rendimentos em óleo que aqueles ao utilizar partículas de tamanho maior 1,18 mm, pois maior parte do soluto fica exposto ao solvente, facilitando a extração. Assim, os ensaios de extração com CO_2 supercrítico

foram realizados com partículas de granulometria de 0,6 mm. Como o tamanho das partículas é menor, há maior contato do solvente com o substrato, facilitando a extração do óleo e evidenciando, assim, que o tamanho da partícula é um atributo importante para o rendimento de óleo. Sendo assim, a granulometria influenciou significativamente no rendimento da extração, ou seja, quanto maior o tamanho da partícula da amostra, maior o rendimento. Na condição experimental de 250 bar e 40 °C (1,18 mm), o rendimento foi 33,41%, portanto, menor que na mesma condição operacional, porém com 0,6 mm, confirmando que o tamanho da partícula é um atributo importante para o rendimento de óleo.

Nagy e Simándi (2008) realizaram a extração do óleo de colorau, utilizando diferentes tamanhos de partículas e observaram que, ao diminuir o tamanho das partículas, ocorre um aumento da eficiência da extração realizada a partir de dióxido de carbono e o óleo foi removido mais rapidamente quando as partículas apresentaram um tamanho médio de 0,2 mm.

Mira et al. (1996) relataram que, na extração do óleo da casca de laranja desidratada utilizando dióxido de carbono como solvente, o coeficiente de transferência de massa diminui com o aumento do tamanho das partículas da casca de laranja, assim como foi constatado neste trabalho. ASEP et al. (2008) na extração do óleo de cacau também observaram maiores rendimentos em partículas menores.

Em processos de extração controlados por resistências internas à transferência de massa, o tamanho médio da partícula assume um papel importante, sendo que um tamanho de partícula menor reduz o trajeto do solvente. De acordo com Reverchon e De Marco (2006), a produção de partículas muito pequenas pela moagem poderia favorecer a perda de compostos voláteis.

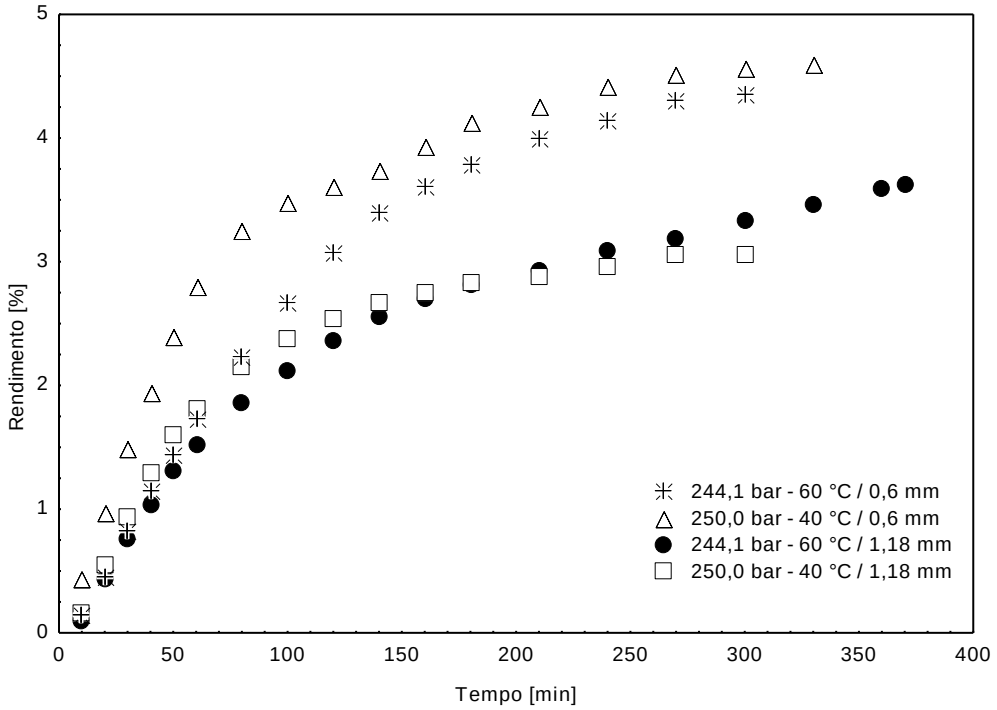


Figura 4.1. Extrações do óleo das sementes de *Mucuna deeringiana* utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas como solvente em diferentes tamanhos de partículas.

4.1.2.2. Avaliação do efeito das variáveis de processo

Para a extração do óleo a partir do CO_2 em condições supercríticas foram avaliados os seguintes parâmetros de extração: pressão, temperatura e densidade do solvente. Na Tabela 4.2, são apresentados os valores de densidade do CO_2 e as diferentes condições de temperatura e pressão, assim como os respectivos rendimentos em óleo obtidos. Para efeito de comparação, os resultados obtidos para a utilização de solventes orgânicos são novamente apresentados na Tabela 4.2.

Os tempos de extração do óleo das sementes de *Mucuna* não foram idênticos em cada condição. O tempo final da extração foi definido a partir do momento em que a massa de óleo não apresentou mais uma variação significativa. O cálculo do rendimento de extração foi realizado após um período fixo de extração (300 min), a fim de permitir uma comparação direta entre os resultados obtidos em diferentes condições experimentais.

De acordo a Tabela 4.2, a condição experimental que apresentou o maior rendimento em óleo foi na pressão de 250 bar, para as três variedades de *Mucuna*, e também foi a condição que apresentava a maior densidade do

solvente em 0,88 g mL^{-1} e temperatura de extração 40 °C. O menor rendimento de óleo foi observado na condição 2, 8 e 14 que apresenta a menor densidade do CO_2 (0,68 g mL^{-1}).

A pressão foi uma das variáveis que mais influenciou no processo de extração, pois os maiores rendimentos foram obtidos nas condições 3 e 4 (*Mucuna aterrima*), que foram realizadas na pressão de 244,1 bar e 250 bar, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Kiriamiti et al. (2001) e Salgin et al. (2006), que extraíram óleo de sementes de girassol utilizando CO_2 supercrítico e concluíram que o processo de extração é limitado pela solubilidade do soluto no CO_2 supercrítico e que as taxas de extração aumentaram com o aumento da pressão do processo, pois esse aumento na pressão causa um aumento da solubilidade do óleo no dióxido de carbono.

De acordo com Brunner (1994), com o aumento da densidade, ocorre um aumento na taxa de extração, em temperatura constante, este fato pode ser observado nas condições experimentais 2 e 3, que foram realizadas na mesma temperatura (60 °C), porém com pressão (176,7 bar e 244,1 bar) e densidades (0,68 g mL^{-1} e 0,78 g mL^{-1}) diferentes, obtendo rendimentos em óleo de 1,98 % e 2,83 %, para as condições 2 e 3, respectivamente, indicando que em maiores densidades a taxa de extração de óleo é maior. Este fato também foi observado para as variedades de *Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana.*

A EFS apresenta-se como um processo mais rápido e seletivo e que não necessita de processos posteriores para a obtenção de compostos de interesse. Contudo, observa-se um maior rendimento na extração por solvente orgânico, pois ele não apresenta seletividade como no caso da EFS.

Ao comparar os resultados obtidos pela EFS com os dados da extração por solvente orgânico (Soxhlet), constatou-se maior rendimento na extração com solvente orgânicos, pois o tempo de extração é prolongado e a extração é menos seletiva, o que pode ter contribuído para um maior rendimento com relação aos valores de EFS.

De acordo com Azevedo (2001), o aumento da pressão, à temperatura constante, tem efeito na solubilidade devido ao fato da capacidade de solubilização dos fluidos supercríticos estarem diretamente relacionada à densidade. Incrementos na pressão e temperatura constante elevam a densidade do fluido, ocasionando um aumento no poder da solubilização.

Tabela 4.2. Condições experimentais e rendimento em óleo das variedades de *Mucuna* obtido por dióxido de carbono em condições supercríticas

Condição	Variedade	Solvente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade do solvente ($g\ mL^{-1}$)	Rendimento (m/m)
1	*Mucuna aterrima*	CO_2	150	40	0,78	2,17
2	*Mucuna aterrima*	CO_2	176,7	60	0,68	1,98
3	*Mucuna aterrima*	CO_2	244,1	60	0,78	2,83
4	*Mucuna aterrima*	CO_2	250	40	0,88	2,90
5	*Mucuna aterrima*	DMC	-	-	-	5,23
6	*Mucuna aterrima*	HEX	-	-	-	5,33
7	*Mucuna cinerium*	CO_2	150	40	0,78	2,05
8	*Mucuna cinerium*	CO_2	176,7	60	0,68	1,87
9	*Mucuna cinerium*	CO_2	244,1	60	0,78	2,61
10	*Mucuna cinerium*	CO_2	250	40	0,88	2,74
11	*Mucuna cinerium*	DCM	-	-	-	5,22
12	*Mucuna cinerium*	HEX	-	-	-	6,93
13	*Mucuna deeringiana*	CO_2	150	40	0,78	3,53
14	*Mucuna deeringiana*	CO_2	176,7	60	0,68	2,27
15	*Mucuna deeringiana*	CO_2	244,1	60	0,78	4,35
16	*Mucuna deeringiana*	CO_2	250	40	0,88	4,59
17	*Mucuna deeringiana*	DCM	-	-	-	6,85
18	*Mucuna deeringiana*	HEX	-	-	-	7,44

Na Figura 4.2, são apresentadas as curvas cinéticas da extração do óleo das sementes de *Mucuna*, das três variedades analisadas neste trabalho. Observa-se que o maior rendimento de óleo foi apresentado na temperatura de 40 ºC e pressão de 250 bar, na qual podemos observar que a taxa inicial de extração é superior quando comparada às demais condições, evidenciando um alto poder de solvatação do solvente, nestas condições, efeito este constatado no trabalho de Arias et al. (2009). Este efeito também foi constatado por Hamdan et al. (2007), Corso et al. (2010) e Freitas et al. (2008) na extração de óleos de sementes de cardamomo, gergelim e uva, respectivamente.

Nas condições experimentais que foram extraídas em uma mesma densidade (0,78 g mL^{-1}), porém em temperatura (40 °C e 60 °C) e pressão (150 bar e 244,1 bar) diferentes, apresentaram rendimentos diferenciados, indicando que a densidade não atuou como fator isolado. Quando comparado os resultados das condições realizadas com a mesma temperatura (60 °C), podemos observar que, com o aumento da pressão, observamos maior rendimento na extração de óleo devido a maior solvatação dos analitos presentes na amostra, diminuindo desta forma o tempo de extração.

De acordo com Recasens et al. (1999), a solubilidade é dependente da temperatura, pressão, composição e natureza do solvente. Quanto maior for a solubilidade do soluto no solvente extrator, a quantidade de produto extraído será maior em um tempo menor. Os resultados apresentados na Figura 4.2 indicam que a pressão 250 bar e temperatura 40 °C é a condição mais apropriada para extração do óleo das sementes de *Mucuna*, pois a quantidade de óleo extraída em relação à massa de solvente usada foi superior.

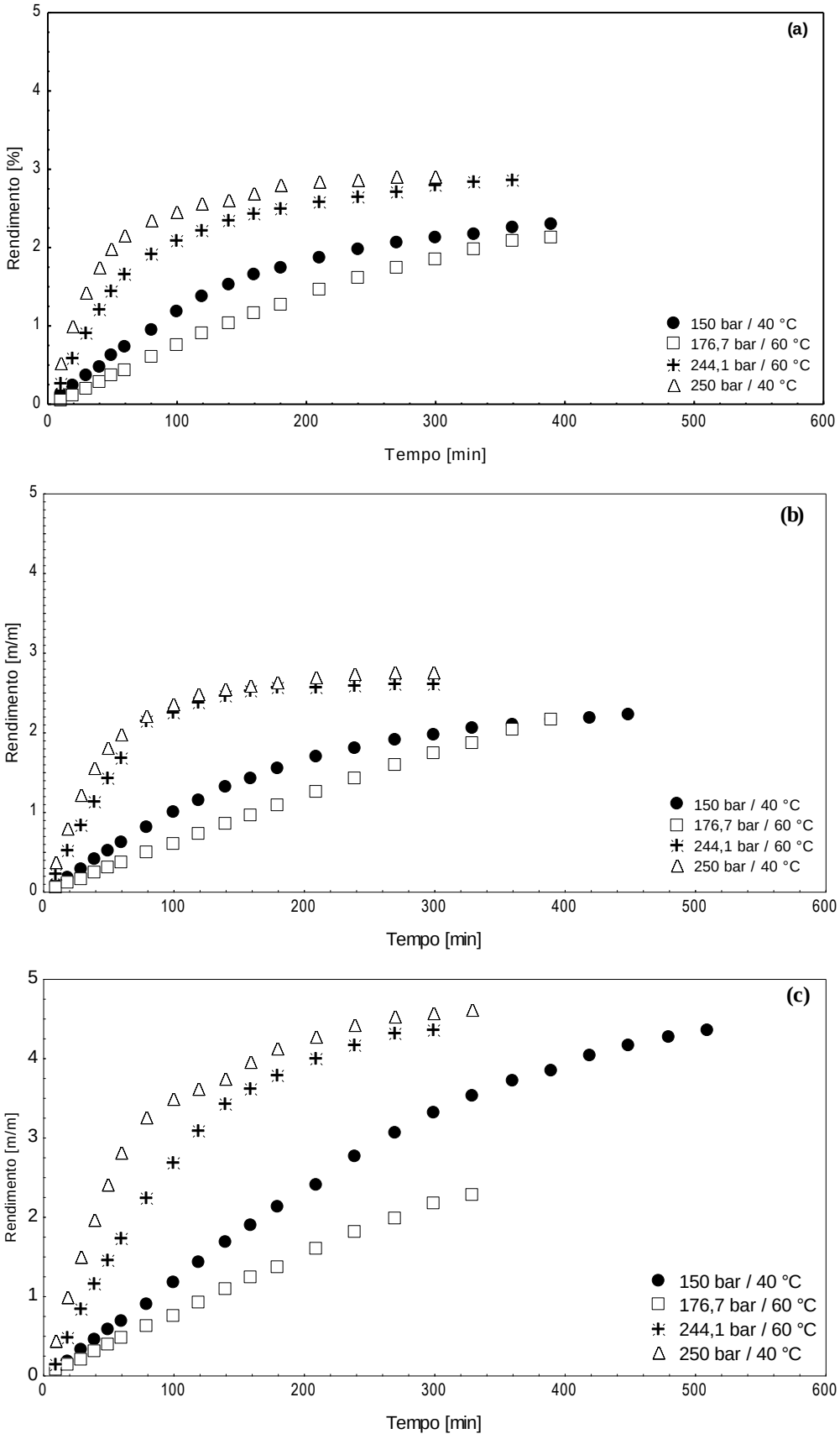


Figura 4.2**.** Cinética de extração do óleo das sementes de *Mucuna* utilizando dióxido de carbono em condições pressurizadas como solvente: (a) *Mucuna atterima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana.*

4.2. Modelagem matemática da EFS

O modelo matemático empregado para a descrição das curvas de extração foi o modelo matemático baseado numa cinética empírica de segunda ordem, e as hipóteses utilizadas para sua obtenção já apresentadas. Os valores estimados da constante cinética k são apresentados na Tabela 4.3 juntamente com outros valores de parâmetros do modelo de transferência de massa utilizado neste trabalho. Onde: M é a massa de material vegetal (g); Q_f é a vazão de extração (mL min^{-1}); ε é a porosidade do leito; ρ_{CO2} é a densidade do dióxido de carbono (g mL^{-1}); ρ_{leito} é a densidade no leito (g mL^{-1}); C_{eq} é a concentração de equilíbrio no solvente (g mL^{-1}); e k é a constante cinética (mL.kg min^{-1}).

A estimação do parâmetro (K) do modelo cinética de segunda ordem para as extrações com o CO_2 supercrítico foi obtida a partir dos dados experimentais e da minimização da função objetivo, dada pela Eq. (3.7).

Pode-se observar que o parâmetro K não apresentou uma correlação padrão com os valores de Ceq para as condições avaliadas. Souza et al. (2008), estudando a extração supercrítica de candeia com CO_2, apresentaram valores de K maiores para os experimentos realizados em condição de maior densidade do solvente e maior Ceq.

A partir dos parâmetros apresentados na Tabela 4.9, as curvas cinéticas de extração foram simuladas para o modelo de segunda ordem. As cinéticas de extração experimental e o do modelo das sementes de *Mucuna* são apresentadas na Figura 4.3 (a), (b) e (c) para todas as condições experimentais com CO_2.

Tabela 4.3. Condições experimentais e parâmetros do modelo de transferência de massa propostos para os dados experimentais

Parâmetros	***Mucuna aterrima***				***Mucuna cinerium***				***Mucuna deeringiana***			
	40 °C 150 bar	**60 °C 176,7 bar**	**60 °C 244,1 bar**	**40 °C 250 bar**	**40 °C 150 bar**	**60 °C 176,7 bar**	**60 °C 244,1 bar**	**40 °C 250 bar**	**40 °C 150 bar**	**60 °C 176,7 bar**	**60 °C 244,1 bar**	**40 °C 250 bar**
$M_{C.B.}$ (g)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Q_f (mL min^{-1})	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ε	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
ρ_{CO2} (g mL^{-1})	0,78	0,68	0,78	0,88	0,78	0,68	0,78	0,88	0,78	0,68	0,78	0,88
ρ_{leito} (g mL^{-1})	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
C_{eq} (g mL^{-1})	0,0015	0,0008	0,0036	0,0061	0,0012	0,0007	0,0033	0,0046	0,0016	0,0009	0,0039	0,0055
k (mL g min^{-1})	4,87	9,91	3,90	2,29	6,35	17,78	8,35	4,69	4,97	7,81	5,69	2,81

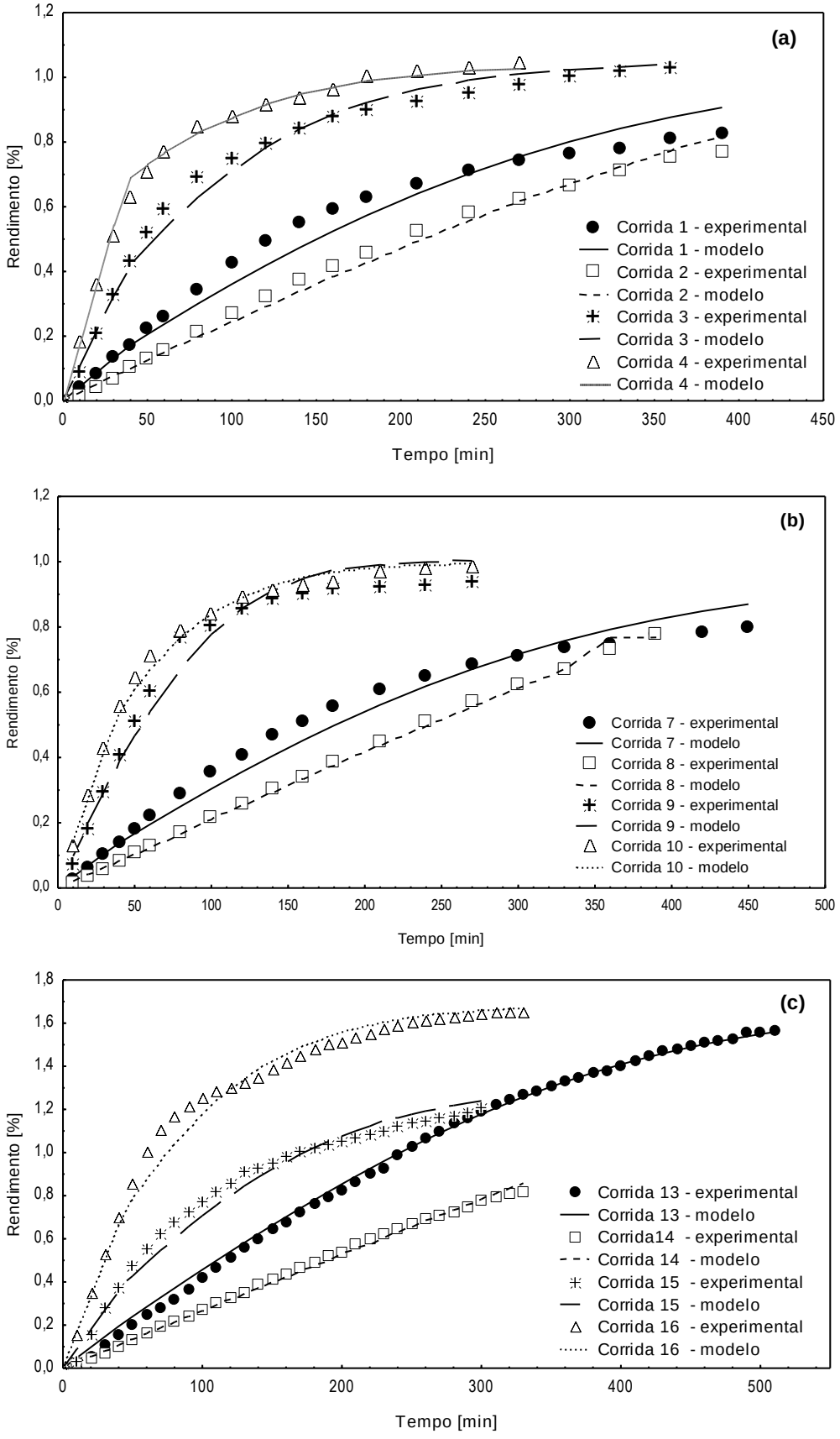


Figura 4.3. Modelos matemáticos de segunda ordem para as cinéticas experimentais de extração do óleo das sementes usando CO_2 supercrítico. (a) *Mucuna aterrima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana.*

Analisando a Figura 4.3, nota-se que o modelo de segunda ordem descreve satisfatoriamente a cinética de extração do óleo de *Mucuna* obtido a partir do dióxido de carbono em condições pressurizadas.

Souza et al*.* (2008) realizaram a extração do óleo das sementes de Candeia (*Eremanthus erythropappus*) utilizando dióxido de carbono em condições supercríticas como solvente e, para representar a cinética de extração, foi empregado o modelo matemático de segunda ordem e, com base na comparação dos dados experimentais e teóricos, observaram que o modelo descreve satisfatoriamente a cinética de extração em todos os casos estudados, assim como foi constatado neste trabalho. Este efeito também foi observado por Esquível et al*.* (1999), na extração do óleo da casca de oliva e Pederssetti et al*.* (2011), na extração do óleo de Canola (*Brassica napus*), utilizando dióxido de carbono em condições pressurizadas como solvente.

4.3. Análise dos ácidos graxos totais

A análise dos ácidos graxos totais foi realizada nos óleos das sementes das variedades *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana,* obtidas a partir de solventes orgânicos (diclorometano e hexano) e CO_2 em condições pressurizadas*.* Todas as análises foram realizadas em duplicata e o valor representado é a média dos resultados obtidos. Na Tabela 4.3, estão apresentados os principais ácidos graxos encontrados nas amostras analisadas e o teor presente em cada condição de extração.

A análise do óleo das sementes de *Mucuna* extraído em diferentes temperaturas e pressões investigadas neste estudo não revelou diferenças significativas entre os resultados, considerando um nível de significância de 5%, e obtiveram distribuições semelhantes de ácidos graxos. Pederssetti et al*.* (2010) estudaram a extração de óleo de sementes de canola; Corso et al*.* (2010) a extração de óleo de sementes de gergelim; e Nimet et al*.* (2011) a extração do óleo de semente de girassol, ambos usando dióxido de carbono supercrítico e também descobriram que este solventes não influenciaram significativamente na distribuição de ácidos graxos no óleo extraído.

A Tabela 4.4 mostra que o principal componente dos óleos obtidos em diferentes variedades e condições experimentais foi o ácido linoleico (ômega-6), com percentual entre 40% e 47%, seguido pelo ácido palmítico (17% a

26%) e ácido oleico (10 % para 17%). O ácido linolênico (ômega-3) é encontrado no óleo das sementes de *Mucuna cinerium* com percentagens de 9% e 5% para *Mucuna aterrima* e *Mucuna deeringiana,* para o óleo obtido a partir de dióxido de carbono supercrítico, diclorometano e hexano. Ezeagu et al. (2005) e Ajayi et al. (2006) determinaram a composição de ácidos graxos (%) de óleo extraído a partir de éter de petróleo (variação de ponto de ebulição 40-60 °C) a partir de sementes de *Mucuna* variedades *Mucuna utilis*, *Mucuna cochinchinesis* e *Mucuna pruriens* var IRZ e os resultados obtidos foram semelhantes aos deste estudo.

Tabela 4.4. Quantificação dos ácidos graxos totais em sementes de *Mucuna* expressos em porcentagem de massa: (a) *Mucuna aterrima;* (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana.*

(a)	**Condições Experimentais**					
	40 °C 150 bar	**60 °C 176,7 bar**	**60 °C 244,1 bar**	**40 °C 250 bar**	**DCM**	**HEX**
Ácido palmítico	26 ±0,3	26 ±0,1	26 ±0,2	26 ±0,7	17 ±0,2	17 ±0,5
Ácido palmitoleico	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1	0,2 ±0,1	0,3 ±0,1
Ácido esteárico	7,4 ±0,1	7,4 ±0,9	7,5 ±0,2	7,5 ±0,3	9,3 ±0,1	9,1 ±0,3
Ácido oleico	10 ±1,8	11 ±1,0	11 ±0,1	11 ±0,1	11 ±0,1	11 ±0,5
Ácido linoleico	46 ±0,8	46 ±2,0	45 ±0,3	45 ±0,7	46 ±0,6	46 ±0,8
Ácido linolênico	5,2 ±0,2	5,1 ±0,3	5,0 ±0,1	5,1 ±0,1	9,0 ±0,4	9,2 ±0,2
Ácido araquídico	1,3 ±0,2	1,2 ±0,1	1,3 ±0,1	1,3 ±0,3	1,6 ±0,1	1,4 ±0,1
Ácido behênico	2,9 ±0,2	3,0±0,5	3,1 ±0,1	3,1 ±0,6	2,9 ±0,4	2,7 ±0,1
Ácido lignocérico	1,0 ±0,4	1,1 ±0,9	1,0 ±0,1	0,9 ±0,3	1,0 ±0,5	0,9 ±0,1

Tabela 4.4. Cont.

(b)	Condições Experimentais					
	40 °C 150 bar	60 °C 176,7 bar	60 °C 244,1 bar	40 °C 250 bar	DCM	HEX
Ácido palmítico	20 ±0,1	20 ±0,9	21 ±0,3	20 ±0,3	18 ±0,4	18 ±0,6
Ácido palmitoleico	0,3 ±0,7	0,3 ±1,1	0,3 ±0,3	0,3 ±0,5	0,2 ±0,1	0,2 ±0,1
Ácido esteárico	9,3 ±0,1	9,0 ±0,1	9,2 ±0,1	9,2 ±0,1	11 ±0,4	11 ±0,2
Ácido oleico	16 ±0,1	16 ±0,1	16 ±0,1	17 ±0,5	15 ±0,3	16 ±0,3
Ácido linoleico	43 ±0,4	43 ±0,8	43 ±0,2	42 ±0,6	42 ±1,1	42 ±0,4
Ácido linolênico	8,8 ±0,2	8,7 ±0,1	8,9 ±0,1	8,8 ±0,1	5,1 ±0,1	5,0 ±0,1
Ácido araquídico	2,0 ±0,1	1,9 ±0,2	1,9 ±0,1	2,0 ±0,2	1,5 ±0,2	1,2 ±1,4
Ácido behênico	3,0 ±0,1	2,9 ±0,3	3,1 ±0,2	2,9 ±0,5	3,6 ±0,3	3,7 ±0,1
Ácido lignocérico	0,7 ±0,1	0,7 ±0,2	0,7 ±0,5	0,8 ±0,2	1,0 ±0,2	1,2 ±0,1

(c)	Condições Experimentais					
	40 °C 150 bar	60 °C 176,7 bar	60 °C 244,1 bar	40 °C 250 bar	DCM	HEX
Ácido palmítico	21 ±0,0	21 ±0,3	20 ±0,1	20 ±0,6	17 ±0,5	17 ±0,9
Ácido palmitoleico	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,2 ±0,1	0,2 ±0,1	0,2 ±0,1	0,1 ±0,1
Ácido esteárico	11 ±0,1	11 ±0,1	11 ±0,1	11 ±0,8	9,0 ±0,9	9,0 ±0,4
Ácido oleico	16 ±0,1	16 ±0,1	15 ±0,1	15 ±0,7	10 ±1,2	10 ±0,9
Ácido linoleico	42 ±0,2	40 ±0,2	42 ±0,7	42 ±1,1	47 ±0,8	47 ±1,2
Ácido linolênico	4,9 ±0,2	5,0 ±0,6	5,1 ±0,1	4,9 ±0,5	6,8 ±0,2	6,7 ±0,9
Ácido araquídico	1,9 ±0,2	2,0 ±0,1	2,0 ±0,2	1,9 ±0,8	1,0 ±0,3	1,1 ±0,2
Ácido behênico	3,1 ±0,1	2,9 ±0,2	3,0 ±0,3	3,0 ±0,5	3,2 ±1,0	3,1 ±0,2
Ácido lignocérico	1,0 ±0,1	1,1 ±0,1	1,0 ±0,2	1,1 ±0,1	0,5 ±0,1	0,6 ±0,2

De acordo com Bhat et al. (2007), o óleo de *Mucuna* é rico em ácidos graxos insaturados, o que está de acordo com os dados reportados neste trabalho, uma vez que os ácidos graxos insaturados representam mais de 50 % da composição total do óleo das três variedades de *Mucuna*.

A Figura 4.4 apresenta um exemplo de cromatograma representativo, obtido para o óleo de semente de *Mucuna* extraído por CO_2. Os demais cromatogramas obtidos apresentam-se semelhantes a este e por isso não serão apresentados aqui.

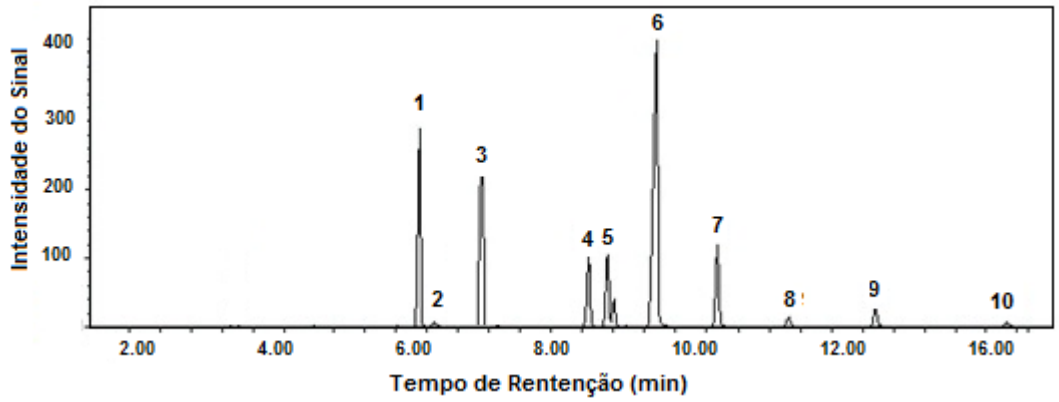


Figura 4.4. Cromatograma representativo da extração de óleo das sementes de *Mucuna*. (1) ácido palmítico; (2) ácido palmitoleico; (3) padrão interno ;(4) ácido esteárico; (5) ácido oleico; (6) ácido linoleico; (7) ácido linolênico; (8) ácido araquídico; (9) ácido behênico; (10) ácido Lignocérico.

4.4. Análise dos compostos livre de glicerol

Os óleos vegetais são compostos basicamente formados de triglicerídeos e contaminantes, como ácidos graxos livres (AGL), fosfatídeos (gomas), matéria graxa, pigmentos e substâncias voláteis que conferem odores e sabores indesejados, como os aldeídos, as cetonas e os terpenos. O estudo dos compostos minoritários presentes nos óleos procura avaliar alterações na composição destes óleos por influência de alguma das variáveis aplicadas (temperatura, pressão e densidade). Os compostos livres de glicerol presentes nas amostras de óleos, tanto obtidas em condições supercríticas como por métodos de extração convencionais, são responsáveis pelo grau de acidez em óleos vegetais. A Tabela 4.5 apresenta a identificação dos compostos encontrados no óleo das sementes de *Mucuna* obtidas por EFS, utilizando como solvente CO_2, diclorometano e hexano, de acordo com as condições experimentais apresentadas na Tabela 3.1. Entre os compostos presentes na Tabela 4.5 estão o campesterol e estigmasterol, que se apresentam na forma não esterificada.

Tabela 4.5. Identificação dos compostos presentes no óleo das sementes de *Mucuna* (CO_2, diclorometano, hexano) em condições experimentais apresentadas na Tabela 4.2

		Condições Experimentais																	
Composto	**Nome**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
$C_{19}H_{40}O_2Si$	ácido palmítico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{21}H_{32}O_2Si$	ácido linolenico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{21}H_{40}O_2Si$	ácido linoleico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{21}H_{42}O_2Si$	ácido oleico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{21}H_{44}O_2Si$	ácido esteárico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{23}H_{48}O_2Si$	ácido araquídico[a]	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x
$C_{25}H_{51}O_2Si$	ácido hexacozanoico[a]	x	x		x			x	x		x			x	x		x		
$C_{25}H_{54}O_4Si$	monopalmitina[a]	x	x	x		x		x	x	x		x		x	x	x		x	
$C_{25}H_{52}O_2Si$	ácido behênico[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{27}H_{56}O_2Si$	ácido lignocérico[a]	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x
$C_{28}H_{48}O$	campesterol	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x
$C_{29}H_{50}O_2$	tocoferol			x		x				x		x				x		x	
$C_{32}H_{56}OSi$	estigmasterol[a]	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
$C_{32}H_{58}OSi$	β-sitosterol[a]	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x
$C_{38}H_{76}O_2Si$	dipalmitina[a]						x						x						x

[a] Identificado com o derivatizantes TMS.

De acordo com Jacques et al. (2005), os derivados de estigmasterol são conhecidos por possuírem atividade antioxidantes. Quando se faz extrações com fluido supercrítico, procura-se maior seletividade na extração de compostos. Os resultados demonstram que, a partir dióxido de carbono, pode-se obter um maior número de compostos livres de glicerol. Os fitosteróis mais comuns encontrados em óleos vegetais são o campesterol, sitosterol, sitostanol, brassicasterol e o estigmasterol (BONVEHÍ et al., 2001), conhecidos por reduzir a absorção do colesterol quando incluídos na dieta humana. Outros benefícios à saúde também são reportados em estudos, como a atividade antiinflamatória e antitumoral (BONVEHÍ et al., 2001; BORTOLOMEAZZI et al., 2003). Foram identificados no óleo de *Mucuna* das variedades estudadas o campesterol, estigmasterol e o β-sitosterol, que se apresentam na forma não esterificada.

Na fração de compostos que não está ligada ao glicerol, foram quantificados os ácidos graxos livres em amostras das sementes de *Mucuna* extraídas por Soxhlet e EFS. A Tabela 4.6 apresenta o percentual de compostos livres de glicerol presentes no óleo das sementes de *Mucuna.* A análise estatística dos teores de ácidos graxos livres não revelou diferenças significativas entre os resultados, considerando um nível de significância de 5%.

O valor nutricional de um óleo depende, em alguns aspectos, do montante de ácidos graxos livres que apresenta. De acordo com Ajayi et al. (2006), o limite máximo desejável de ácidos graxos livres presente em óleo é de 5 % e o fato dos níveis de AGL em todos os óleos investigados estarem abaixo deste percentual indica que os óleos poderiam ser armazenados por um longo tempo sem deterioração via ranço oxidativo. A análise quantitativa dos componentes majoritários do óleo das sementes de *Mucuna* não apresentou diferença significativa entre o dióxido de carbono em condições supercrítica e os métodos clássicos de extração.

Tabela 4.6. Análise quantitativa dos ácidos graxos livres presentes no óleo das sementes de *Mucuna* expressos em porcentagem de massa.

	Condições Experimentais					
	40 °C 150 bar	**60 °C 176,7 bar**	**60 °C 244,1 bar**	**40 °C 250 bar**	**DCM**	**HEX**
Mucuna aterrima	4,31 ±0,4	4,79 ±0,3	4,42 ±0,0	4,26 ±0,2	3,61 ±0,1	3,92 ±0,3
Mucuna cinerium	4,27 ±0,4	4,74 ±0,1	4,59 ±0,4	4,12 ±0,2	3,56 ±0,0	3,91 ±0,4
Mucuna deeringiana	4,32 ±0,4	4,66 ±0,1	4,57 ±0,1	4,15 ±0,2	3,51 ±0,3	3,83 ±0,1

De acordo com Instituto Adolf Lutz (1985), a decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Desta forma, os óleos vegetais que apresentam um elevado teor de ácidos graxos livres são considerados ranços. Em relação ao óleo das sementes de *Mucuna* os compostos livres de glicerol apresentaram percentuais abaixo de 5 %, em todas as condições operacionais avaliadas.

4.5. Quantificação de l-dopa no farelo desengordurado

Através das extrações supercríticas, realizada pelo contato contínuo do solvente supercrítico com o extrato sólido, o óleo do farelo de *Mucuna* é removido e o L-Dopa não é arrastado juntamente com o óleo, permanecendo no farelo desengordurado. A Tabela 4.7 apresenta as condições experimentais de extração, tempo total de cada extração, percentual de óleo e conteúdo de L-Dopa presente no farelo desengordurado. Para tentar uma extração exaustiva com o solvente comprimido, o tempo total de extração depende da condição experimental. O tempo de extração para cada corrida experimental foi usado para calcular o percentual de extração em comparação com o rendimento de extração, obtida pela extração com diclorometano e hexano (extração Soxhlet).

Tabela 4.7. Condições experimentais e percentual de L-Dopa presentes no farelo desengordurado obtido por diclorometano, hexano e dióxido de carbono em condições supercríticas

Condição	Espécie *Mucuna*	Solvente	P (bar)	T (°C)	Rendimento[a] (%)	Tempo (min)	Rendimento[b] (%)	Rendimento[c] (%)	L-Dopa (%)
1	*Mucuna aterrima*	CO_2	150	40	2,30	390	43,98	43,15	4,17
2	*Mucuna aterrima*	CO_2	176,7	60	2,13	390	40,73	39,96	3,14
3	*Mucuna aterrima*	CO_2	244,1	60	2,86	360	54,68	53,66	4,41
4	*Mucuna aterrima*	CO_2	250	40	2,90	300	55,45	54,41	4,62
5	*Mucuna aterrima*	DCM	-	-	5,23	480	100	-	2,58
6	*Mucuna aterrima*	HEX	-	-	5,33	480	-	100	2,46
7	*Mucuna aterrima*	-	-	-	-	-	-	-	2,29
8	*Mucuna cinerium*	CO_2	150	40	2,21	450	42,34	31,89	4,72
9	*Mucuna cinerium*	CO_2	176,7	60	2,15	390	41,19	31,02	4,21
10	*Mucuna cinerium*	CO_2	244,1	60	2,61	300	50,00	37,66	4,95
11	*Mucuna cinerium*	CO_2	250	40	2,74	300	52,49	39,54	5,39
12	*Mucuna cinerium*	DCM	-	-	5,22	480	100	-	3,65
13	*Mucuna cinerium*	HEX	-	-	6,93	480	-	100	3,19
14	*Mucuna cinerium*	-	-	-	-	-	-	-	3,00
15	*Mucuna deeringiana*	CO_2	150	40	4,34	510	63,36	58,33	3,93
16	*Mucuna deeringiana*	CO_2	176,7	60	2,27	330	33,14	30,51	3,02
17	*Mucuna deeringiana*	CO_2	244,1	60	4,35	300	63,50	58,47	4,43
18	*Mucuna deeringiana*	CO_2	250	40	4,59	330	67,01	61,69	4,65
19	*Mucuna deeringiana*	DCM	-	-	6,85	480	100	-	2,67
20	*Mucuna deeringiana*	HEX	-	-	7,44	480	-	100	2,17
21	*Mucuna deeringiana*	-	-	-	-	-	-	-	2,54

[a]100 vezes a massa do óleo extraído pela massa de matéria-prima utilizada.
[b]100 vezes a massa do óleo extraído no fim do tempo de extração total da massa do óleo extraído com diclorometano.
[c] 100 vezes a massa do óleo extraído no fim do tempo de extração total da massa do óleo extraído com hexano.

De acordo com Freitas et al. (2008), com o aumento da temperatura, as propriedades do solvente são mais favoráveis, facilitando a penetração do solvente nos poros da matriz vegetal para solubilização do óleo. Também temperaturas altas aumentam a pressão de vapor do óleo, facilitando a extração pelo solvente. Um aumento na pressão facilita a penetração do solvente nos poros da matriz, propiciando o contato do solvente com os componentes a serem extraídos. As melhores solubilidades foram observada nas corridas 3 e 4, para *Mucuna aterrima*, nas quais foram utilizadas pressões mais elevadas. Este efeito também foi constatado por Corso (2008).

Pode ser observado na Tabela 4.7 que percentuais de L-Dopa entre 4,62 %, 5,39 % e 4,65 % foram obtidos para *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana,* respectivamente, sendo que os maiores rendimentos de L-Dopa foram nas condições operacionais que apresentavam o maior rendimento em óleo, para as extrações realizadas a partir do CO_2 supercrítico. A extração do óleo das sementes de *Mucuna* aumentou o rendimento de L-Dopa. Isso pode ser observado comparando as condições operacionais 4 e 7 para *Mucuna atterima*, 11 e 14 para *Mucuna cinerium e* 18 e 21 para a *Mucuna deeringiana,* para os resultados obtidos para EFS. Chikagwa-Malunga et al. (2009) reportou níveis de aproximadamente 2,4 % de L-Dopa em sementes de *Mucuna pruriens*, sem retirar o óleo das sementes. Neste trabalho percentuais de 2,29 %, 2,54 % e 3,0 % são relatados para as variáveis estudas.

Também pode ser notado que o rendimento de óleo das sementes de *Mucuna* foi maior nas extrações realizadas com solvente orgânico, porém o teor de L-Dopa foi menor. Este resultado pode ser observado nas condições operacionais 11 e 13 para dióxido de carbono e hexano como solvente. Isso pode ter ocorrido devido à baixa solubilidade da L-Dopa em dióxido de carbono (MELO et al., 2005) e a menor seletividade do solvente orgânico, conforme constatado por Vatai et al. (2009). O baixo percentual de L-Dopa obtido a partir de solventes orgânicos também foi constatado por Adebowale et al. (2007).

Adebowale et al. (2005) avaliaram as propriedades físico-químicas, nutricionais e anti-nutricionais de seis variedades de *Mucuna* e relatam que a *Mucuna deeringiana* apresenta aproximadamente 3,87 % de L-Dopa. Desta forma, observa-se que as extrações realizadas neste trabalho, a partir de dióxido de carbono supercrítico, são eficientes na concentração deste composto no farelo

desengordurado. Bhat et al. (2008) relataram que variações de L-Dopa em sementes de *Mucuna* têm sido atribuídas a condições ambientais, tais como latitude, intensidade de luz, fonte de nitrogênio. Isto justificaria o fato de outros artigos reportarem maiores valores de L-Dopa em sementes.

Gurumoorthi et al. (2008) relataram que percentual de L-Dopa presente nas sementes de *Mucuna* para as variedades *Thachenmalai, Thachenmalai, Mundanthurai, Mundanthurai, Kailasanadu, Valanadu* e *Mylaru* pode variar de 4,4 % a 5,7 % e o tratamento como imersão em ácido cítrico (1%) pode diminuir os percentuais de L-Dopa presente nas sementes de *Mucuna*. Os seguintes teores de L-Dopa foram relatados para as variedades: *Mucuna andreana* (6,3 %); *Mucuna birdwoodiana* (9,1%); *Mucuna holtonii* (6,13 %); *Mucuna mutisiana* e *Mucuna urens* (4,92 %) (INGLE, 2003).

4.6. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *mucuna*

4.6.1. Método DPPH

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. Um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH, de coloração púrpura. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicular, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998).

Na Tabela 4.8, estão apresentados os resultados da atividade antioxidante (AA %) e o CE_{50} das sementes de *Mucuna* cruas e do farelo desengordurado obtidos a partidos dos solventes diclorometano, hexano e dióxido de carbono em condições supercríticas. A atividade antioxidante apresentada é referente à maior concentração final de farelo testada, que foi de 100 $\mu g\ mL^{-1}$. A análise de variância dos dados foi realizada utilizando o software SAS 9.1.3 (SAS Institute).

A atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* variou entre 75,70 % e 87,40 % e os maiores percentuais de AA foram encontrados no farelo obtido por dióxido de carbono supercrítico. O farelo desengordurado obtido a partir do diclorometano e hexano não apresentou diferença significativa, ao nível de 5 %, para a AA, em relação ao obtido por EFS. Porém, quando é analisado o CE_{50} na condição operacional de 60 °C e 176,7 bar, os valores foram 38,05 $\mu g\ mL^{-1}$, 20,38 $\mu g\ mL^{-1}$e 32,57 $\mu g\ mL^{-1}$, para as variedades *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, respectivamente. Estes valores são menores aos obtidos por diclorometano e hexano, indicando que o farelo desengordurado a partir da EFS possui maior atividade antioxidante, pois quanto menor o valor de CE_{50} maior será a AA.

Valores de concentração eficaz de 51,93 $\mu g\ mL^{-1}$; 44,16 $\mu g\ mL^{-1}$ e 57,28 $\mu g\ mL^{-1}$ foram obtidos para *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, respectivamente, com a utilização do diclorometano. Esses dados estão de acordo com os relatados na literatura, pois, de acordo com Mensor et al. (2001), é esperado que extratos obtidos por solventes polares, caso do diclorometano, apresentem um maior potencial antioxidante por concentrarem grande número de moléculas fenólicas.

Os valores de AA para as sementes de *Mucuna* cruas, sem nenhum tratamento, foram 85,21 %; 82,03 % e 86,71 %, para *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, respectivamente, indicando que a variedade que apresenta a menor AA é a *Mucuna cinerium,* pois na mesma concentração que as outras variedades de *Mucuna* o consumo de DPPH foi menor. Isso também foi constato, pois apresenta o maior valor de CE_{50} (63,21 $\mu g\ mL^{-1}$), ou seja, necessita de uma maior quantidade de sementes para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

A atividade antioxidante apresentada pelo farelo desengordurado obtido a partir do dióxido de carbono em condições pressurizadas variou entre 75,70 e 87,40 %, entre as três variedades analisadas, que foram superiores aos relatados para *Lathyrus filiformis* (28%), *soja* (7,5-18,9%), que são dois tipos de leguminosas (PRAKASH et al., 2007; PASTOR-CAVADA et al., 2009). Esses valores encontram-se dentro da faixa relatada para certos tipos de sementes

subutilizadas de leguminosas, tais como *Mucuna pruriens* (51%) (RANDHIR et al., 2009) e *Caesalpinia bonducella* (69%) (SHUKLA et al., 2009)

As sementes de *Mucuna aterrima* sem tratamento apresentou um teor de AA de 85,21 % e este valor não apresentou diferença significativa, ao nível de 5 %, em relação ao farelo desengordurado obtido a partir do dióxido de carbono supercrítico, diclorometano e hexano, indicando que esses tratamentos não influenciaram na atividade antioxidante das sementes de *Mucuna aterrima.*

Tabela 4.8. Avaliação do potencial antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* usando o método DPPH.

Condições Experimentais	***Mucuna aterrima***		***Mucuna cinerium***		***Mucuna deeringiana***	
	AA (%)	**CE_{50}***	**AA (%)**	**CE_{50}***	**AA (%)**	**CE_{50}***
Sementes cruas	85,21±1,5^{abc}	57,81	82,03±1,7^{cd}	63,21	86,71±1,2^{ab}	59,92
40 °C – 150 bar	83,70±0,1^{abcd}	49,18	84,42±1,3^{abcd}	41,96	75,70±0,4^{e}	64,49
60 °C – 176,7 bar	84,09±0,9^{abcd}	38,05	84,69±0,7^{abcd}	20,38	84,78±0,1^{abcd}	32,57
60 °C – 244,1 bar	83,81±0,7^{abcd}	50,18	82,90±0,3^{bcd}	48,93	84,78±1,1^{abcd}	43,01
40 °C – 250 bar	83,28±0,1^{abcd}	43,92	80,79±0,9^{d}	40,80	87,40±0,4^{a}	46,92
Diclorometano	84,45±0,8^{abcd}	51,93	81,51±0,1^{cd}	44,16	86,36±0,2^{ab}	57,28
Hexano	85,42±0,3^{abc}	53,82	81,74±0,1^{cd}	57,24	86,42±0,3^{ab}	67,60

*$\mu g\ mL^{-1}$

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, entre linhas e colunas.

De acordo com a tabela 4.6, com o aumento da pressão (176,7 – 244,1 bar), em temperatura constante (60 °C), os valores de EC_{50} também aumentam para as três variedades analisadas. Este resultado indica que o aumento da pressão e, consequentemente, a densidade do fluido supercrítico, diminui a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante presentes nos extratos obtidos por EFS.

Segundo Reynertson et al (2005), um extrato cujo valor CE_{50} é menor que 50 $\mu g\ mL^{-1}$ é considerado muito ativo e isso pode ser observado em algumas condições para o farelo desengordurado obtido a partir do dióxido de carbono em condições supercríticas.

Os valores de concentração eficaz de 50 % para as sementes cruas de *Mucuna* foram 57,81 μg mL^{-1}; 63,21 μg mL^{-1} e 59,92 μg mL^{-1}, para as variedades *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, respectivamente. Esses valores são maiores em relação aos relatados para o farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas, diclorometano e hexano. Sendo assim, o processo de remoção do óleo das sementes de *Mucuna* contribuiu para aumentar a sua atividade antioxidante, sendo que a condição experimental de 60 °C e 176,7 bar a partir da EFS foi a que apresentou os menores valores de EC_{50} 38,05 μg mL^{-1}; 20,38 μg mL^{-1} e 32,57 μg mL^{-1} para as variedades *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana*, respectivamente.

Valdés et al. (2011) relataram a concentração eficaz para 50 % de atividade antioxidantes em feijões submetidos a diferentes tratamentos e os seguintes percentuais foram encontrados: para o feijão cru (0,049 g mg^{-1} de DPPH;, feijão cozido (0,066 g mg^{-1} de DPPH); e feijão imerso em água (0,142 g mg^{-1} de DPPH).

Kumar et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante do extrato *Mucuna pruriens* submetidos a diferentes processos de extração a partir de solventes orgânicos e os valores de CE_{50} foram 1230 μg mL^{-1}, 420 μg mL^{-1}, 1030 μg mL^{-1}, para o extrato obtido a partir de éter de petróleo, acetato de etila e metanol, respectivamente, indicando que a atividade antioxidante relatada para as variedades de *Mucuna* analisadas nesta pesquisa apresentam maior atividade antioxidante em relação à variedade *Mucuna pruriens*. Porém, Kumar et al. (2010) utilizaram a planta de *Mucuna* inteira e na presente pesquisa foi avaliado apenas a atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes.

De acordo com Du e Li (2012), que separaram um extrato etanólico das folhas de *Mucuna sempervirens* utilizando um HSCCC (Cromatografia contracorrente de alta velocidade), o teste da atividade antioxidante com os compostos ácido p-hidroxibenzóico, luteolina-8-c-a-larabinoside e isovitexina, apresentaram o CE_{50} 35,8 μM; 54,3 μM e 52,3 μM, respectivamente, indicando que os valores reportados neste trabalho estão de acordo com os compostos isolados relatados na literatura.

Tripathi e Upadhyay (2001) relataram rica atividade antioxidante em sementes de *Mucuna*. Skerget et al*.* (2005) opinaram que a atividade antioxidante produzida pela maioria das plantas é devido principalmente à presença de compostos fenólicos. De acordo com Bhat et al*.* (2007), a possível explicação para a redução de radicais livres em cotilédones de sementes de *Mucuna* irradiados pode ser atribuído ao aumento da varredores de radicais livres em particular os polifenois.

A atividade antioxidante pode ser causada por várias classes de componentes e também pelo sinergismo e interações entre eles a partir da mistura complexa, resultando em uma atividade antioxidante dependente do extrato (ITO et al., 2002). Neste caso, existem outras famílias de substâncias presentes no farelo de interesse, além dos compostos fenólicos que contribuem para a eliminação de radicais livres, tais como terpenóides, carotenóides, tocoferóis, entre outros, que estão influenciando nos resultados da atividade antioxidante.

4.6.2. Compostos fenólicos

A quantidade total de compostos fenólicos presentes no farelo desengordurado foi determinada por meio de uma curva de calibração preparada com ácido gálico, como ilustrado na Figura 3.3. A Tabela 4.9 apresenta o valor dos compostos fenólicos obtidos pelo farelo desengordurado, na EFS, extração convencional e das sementes cruas. O farelo desengordurado obtido por EFS mostraram teores similares aos obtidos por solventes orgânicos. Valores de 4,93 a 5,38 EAG $100g^{-1}$ foram encontrados para o farelo desengordurado das sementes de *Mucuna aterrima*, e 5,21 a 6,51 EAG $100g^{-1}$ e 4,11 a 5,32 EAG $100g^{-1}$, foram relatados para *Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana,* respectivamente. Estes valores estão próximos dos teores de compostos fenólicos encontrados por Elias et al. (1979) em feijões comuns pretos (6,7 g), do teor de 5,65 % encontrados por Siddhuraju e Becker (2005) na semente de *Mucuna pruriens* e também do teor apresentado por Adebowale et al., (2005), nesta mesma espécie, que encontraram 7,75 g $100g^{-1}$ de sementes secas. No entanto, é importante ressaltar que, nos experimentos realizados pelos autores acima citados, foi utilizado como padrão a catequina, diferentemente do padrão

utilizado neste estudo, que foi o ácido gálico e isso pode ter influenciado nos resultados finais obtidos.

O farelo das sementes de *Mucuna* cruas não apresentou diferença significativa, em relação ao farelo desengordurado obtido por EFS e com a utilização de solventes orgânicos (Soxhlet), indicando que o óleo não interfere nos teores de compostos fenólicos presentes nas sementes de *Mucuna.* A diferença dos teores de compostos fenólicos esta relacionada à variedade analisada, à cor do revestimento das sementes, ao solo, às condições ambientais, aos genótipos (cultivar/variedade), às práticas agronômicas (fertilização, irrigação e manejo de pragas), ao nível de armazenamento da colheita e pós-colheita (VADIVEL et al., 2011). A temperatura de extração foi uma variável que influenciou no teor de compostos fenólicos, a *Mucuna cienarium* e *Mucuna deeringiana,* o teor de compostos fenólicos foi relativamente maior, quando a temperatura de extração foi de 60 °C, porém não apresentou diferença estatística ao nível de 5%, entre as condições operacionais.

Os compostos fenólicos do farelo desengordurado obtidos por CO_2 em condições supercríticas variou entre 4,11 a 6,51 EAG $100g^{-1}$. Enquanto para o hexano os compostos fenólicos estão presentes em menor concentração (3,17 a 5,69 EAG $100g^{-1}$). Isso pode ter ocorrido devido à extração a partir do CO_2 ser mais seletiva e pelo tempo de extração ser menor, fazendo com que os compostos fenólicos permanecessem no farelo. Estes valores obtidos a partir do CO_2 são superiores às concentrações relatadas para feijão branco (1,08 g catequina $100g^{-1}$) e ervilha (3,48 g catequina $100g^{-1}$) (AMAROWICZ; PEGG, 2008).

Entre os solventes orgânicos diclorometano e hexano, os maiores percentuais de compostos fenólicos foram encontrados quando o diclorometano foi utilizado, com valores entre 5,10 e 6,29 EAG $100g^{-1}$, evidenciando desta forma que a extração de compostos fenólicos é maior quando são utilizados solventes polares (diclorometano), porém apenas para a *Mucuna cinerium* que evidenciou diferença estatística ao nível de 5 %.

Tabela 4.9. Teor dos compostos fenólicos do farelo desengordurado das sementes de Mucuna expresso em gEAG $100g^{-1}$ de farelo

Condições experimentais	*Mucuna aterrima*	*Mucuna cinerium*	*Mucuna deeringiana*
Sementes cruas	$4,28^{bc}$ ±0,1	$5,50^{ade}$ ±0,1	$4,27^{bc}$ ±0,1
40 °C – 150 bar	$4,95^{abc}$ ±0,1	$5,55^{ade}$ ±0,2	$5,11^{abc}$ ±0,2
60 °C – 176,7 bar	$4,93^{abc}$ ±0,1	$6,51^{e}$ ±0,2	$5,30^{abd}$ ±0,4
60 °C – 244,1 bar	$5,08^{abc}$ ±0,1	$5,98^{ade}$ ±0,1	$5,42^{ad}$ ±0,1
40 °C – 250 bar	$5,38^{ad}$ ±0,1	$5,21^{ab}$ ±0,1	$4,11^{cf}$ ±0,4
Diclorometano	$6,29^{de}$ ±0,2	$5,78^{ade}$ ±0,1	$5,10^{abc}$ ±0,2
Hexano	$5,69^{ade}$ ±0,1	$3,17^{f}$ ±0,1	$4,11^{cf}$ ±0,1

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, entre linhas e colunas.

Nas condições experimentais de 40 °C e 150 bar, não houve diferença significativa ao nível de 5 % para as três variedades de *Mucuna* analisadas neste trabalho e este fato também foi constatado na temperatura de 60 °C e pressão de 244,1 bar. Contudo, estas duas condições experimentais possuem a mesma densidade (0,78 g mL^{-1}), indicando ser uma variável que interferiu no teor de compostos fenólicos presentes na sementes de *Mucuna*.

Vadivel et al*.* (2011) avaliaram o teor de compostos fenólicos presentes em sementes cruas de alguns tipos de leguminosas, como *Abrus precatorius*, *Bauhinia variegata*, *Cassia floribunda*, *Entada scandens*, *Indigofera linifolia*, *Mucuna pruriens*, *Tamarindus indica*, apresentando percentuais entre 4,24 mg g^{-1} e 8,75 mg g^{-1} equivalente a catequina, sendo que, para as sementes cruas de *Mucuna pruriens*, o teor de compostos fenólicos foi de 5,64 mg g^{-1} equivalente à catequina, estando acima dos valores relatados neste trabalho. Isso pode ser explicado pela utilização de diferentes reagentes para curva de calibração, pois, em vez de catequina, foi utilizado ácido gálico.

Adebowale et al*.* (2005) relataram que as sementes de *Mucuna* variedades *Mucuna pruriens*, *Mucuna cochinchnensis*, *Mucuna rajada*, *Mucuna veracruz* (manchada), *Mucuna veracruz* (branca) e *Mucuna deeringiana* possuem

os seguintes teores de compostos fenólicos, respectivamente: 7,75; 6,53; 6,23; 9,23; 5,24 e 4,34 g $100g^{-1}$ equivalente à catequina. O valor de compostos fenólicos relatado para as sementes cruas de *Mucuna deeringiana* neste trabalho estão de acordo com Adebowale et al. (2005).

Boateng et al. (2008) determinaram o teor de compostos fenólicos em feijões, submetidos a dois tratamentos, torrados e embebidos, e encontrou os seguintes valores 6,1 EAG $100g^{-1}$, 5,3 EAG $100g^{-1}$ e 6,7 EAG $100g^{-1}$ para feijões crus, feijões torrados e feijões embebidos, respectivamente.

4.6.3. Relação entre a o teor de L-Dopa, CE_{50} e compostos fenólicos

A Tabela 4.10 apresenta os teores de L-Dopa, concentração eficaz (CE_{50}) e o teor de compostos fenólicos expresso em g ácido gálico $100g^{-1}$ de farelo presentes farelo desengordurado obtidos a partir do dióxido de carbono em condições pressurizadas, diclorometano e hexano e nas sementes cruas. A relação entre a L-Dopa, o CE_{50} e os compostos fenólicos mostra que estes não são os únicos responsáveis pela atividade antioxidante das plantas. A diversidade e complexidade de misturas nos extratos de plantas dificultam a caracterização dos compostos e a determinação da sua atividade antioxidante. Cada planta contém diferentes compostos, como vitaminas, clorofilas e compostos fenólicos com diferentes atividades antioxidantes (DJERIDANE et al., 2006).

O farelo desengordurado das sementes de *Mucuna aterrima* obteve percentuais de L-Dopa de 2,58 % e 2,46 %, para a extração realizada a partir de diclorometano e hexano, respectivamente. O farelo desengordurado obtido a partir do diclorometano apresentou o maior percentual de compostos fenólicos (6,29 EAG $100g^{-1}$) e o menor CE_{50} (51,93 %). Ou seja, existe uma correlação entre o teor de L-Dopa, CE_{50} e compostos fenólicos, evidenciando a maior atividade antioxidante do farelo desengordurado obtido a partir do diclorometano. Este fato também pode ser observado para as varidedade de *Mucuna cinerium* e *Mucuna* deeringiana.

Vadivel et al. (2011) relataram que a concentração de compostos fenólicos em amostras de alimentos depende do tipo de solvente utilizado e a duração do tempo de extração. A *Mucuna deeringiana* apresentou um percentual de compostos fenólicos de 5,10 a 4,11 EAG $100g^{-1}$. Porém, na extração supercrítica, o teor foi de 4,11 a 5,42 EAG $100g^{-1}$ e isso pode ter ocorrido devido à

seletividade do CO_2, que obteve mais afinidade com a L-Dopa, que se apresentou em maiores proporções que com os compostos fenólicos.

Tabela 4.10. Teor de L-Dopa, CE_{50} e compostos fenólicos (C.F.) presentes no farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtido via extração supercrítica e convencional (diclorometano e hexano)

Condição Experimental	*Mucuna aterrima*			*Mucuna cinerium*			*Mucuna deeringiana*		
	L-Dopa*	**CE_{50}***	**C.F.****	**L-Dopa***	**CE_{50}***	**C.F.****	**L-Dopa***	**CE_{50}***	**C.F.****
Sementes cruas	2,29	57,81	4,28	3,00	59,92	5,50	2,54	70,21	4,27
40 °C – 150 bar	4,17	49,18	4,95	4,72	41,96	5,55	3,93	64,49	5,11
60 °C – 176,7 bar	3,14	38,05	4,93	4,21	20,38	6,51	3,02	32,57	5,30
60 °C – 244,1 bar	4,41	50,18	5,08	4,95	48,93	5,98	4,43	43,01	5,42
40 °C – 250 bar	4,62	43,92	5,38	5,39	40,80	5,21	4,65	46,92	4,11
Diclorometano	2,58	51,93	6,29	3,65	44,16	5,78	2,67	57,28	5,10
Hexano	2,46	53,82	5,69	3,19	57,24	3,17	2,17	67,60	4,11

* Percentual (%)
**EAG $100g^{-1}$

Qizhen e Li (2012) relataram que o extrato etanólico das folhas de *Mucuna sempervirens* possuem cerca de 12 flavonóides e dois tipos de ácidos fenólicos, identificados por espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear, sendo que grande parte destes compostos apresentaram uma boa atividade antioxidante, ou seja, a *Mucuna* é uma leguminosa cuja atividade antioxidante está relacionada ao sinergismo entre os compostos que ela possui.

Para as três variedades de *Mucuna* analisadas, o farelo desengordurado, obtido a partir do dióxido de carbono em condições pressurizadas, apresentou os maiores percentuais de L-Dopa e compostos fenólicos e o menor teor de CE_{50} (menor quantidade de sementes para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%), em relação às sementes de *Mucuna* que não foram submetidas a nenhum tipo de extração (sementes cruas). Estes resultados evidenciam que a remoção do óleo das sementes de *Mucuna* a partir do dióxido de carbono contribuiu para aumentar a atividade antioxidante das sementes de *Mucuna,* confirmando a possível atividade antioxidante relatada por Soares et al. (2011).

4.7. Testes de germinação em sementes de soja

A extração de óleos vegetais presente em folhas, sementes e raízes, é realizada a partir de dióxido de carbono em condições pressurizadas, por apresentar uma alta solubilidade, em determinadas condições de pressão e temperatura, aumentando desta forma os rendimento de extração (PEDERSSETTI et al., 2010; CORSO et al., 2010). A L-Dopa apresenta baixa solubilidade em dióxido de carbono supercrítico (Melo et al., 2005) e isso permite concentrar este composto alelopático, pois durante a extração o solvente entra em contato com a amostra e o óleo é removido, mas a L-Dopa permanece no mesmo.

A Tabela 4.11 apresenta as condições experimentais de extração, rendimento em óleo e os teores de L-Dopa obtidos no farelo desengordurado.

Tabela 4.11. Condições experimentais de extração de dióxido de carbono supercrítico e teores de L-Dopa presentes no farelo desengordurado das sementes de *Mucuna deeringiana*

Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Diâmetro das partículas (mm)	Rendimento de Óleo*	% L-Dopa*
01	150,0	40	0,6	4,34	3,93
02	176,7	60	0,6	2,27	3,02
03	244,1	60	0,6	4,35	4,43
04	250,0	40	0,6	4,59	4,65
05	244,1	60	1,18	3,46	2,26
06	250,0	40	1,18	3,05	1,86

*100 mg.

A Tabela 4.12 apresenta os valores médios de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes de soja, tratadas com solução de L-Dopa obtida a partir do farelo desengordurado de *Mucuna deeringiana*. A maior porcentagem de germinação foi de 98% e o maior IVG (índice de velocidade de germinação) 29,64 no tratamento 3. O percentual de germinação nas sementes de soja do tratamento controle (TC) não diferenciou significativamente em relação aos tratamentos realizados a partir do farelo desengordurado, indicando que a L-Dopa aplicada nas sementes não apresentou influência nesta variável. Estes

resultados foram constatados por FORTES et al. (2009), que, avaliando o efeito alelopático da aplicação do extrato aquoso de capim-limão em sementes de soja, constataram que a porcentagem de germinação não foi influenciada por compostos alelopáticos.

Ferreira e Áquila (2000) e Ferreira e Borghetti (2004) relatam que muitas vezes o efeito alelopático não é expressivo sobre a porcentagem de germinação final, mas sim sobre algum outro parâmetro do processo germinativo, evidenciando a importância de um acompanhamento diário da germinação e a determinação da velocidade da mesma, assim como foi observado neste trabalho. Este efeito também foi constatado por Bortoline e Fortes (2005), que avaliaram o efeito de substâncias alelopáticas encontrados em exsudados radiculares de sementes de trigo (*Triticum aestivum*), triticale (*Triticum sp*.), milho (*Zea mays*), ervilhaca (*Vicia sativa)* e aveia preta (*Avena strigosa*) sobre a germinação da soja e constataram que a aplicação de aleloquímicos exsudados não exercem influência na porcentagem de germinação.

Tabela 4.12. Valores médios de germinação e índice de velocidade de germinação de sementes de Soja após 7 (sete) dias de Tratamentos

Tratamento	% de Germinação	IVG	% L-Dopa
TC	98 [a]	23,41 [a]	-
T1	95 [a]	28,33 [b]	3,93
T2	97 [a]	25,70 [a]	3,02
T3	97 [a]	28,94 [b]	4,43
T4	96 [a]	29,64 [b]	4,65
T5	98 [a]	25,34 [a]	2,26
T6	96 [a]	24,04 [a]	1,86

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de confiança.

Quanto ao IVG das sementes de soja, a aplicação da L-Dopa promoveu um aumento significativo da velocidade de germinação quando comparada ao tratamento controle, uma vez que as sementes germinaram em menor tempo. Os tratamentos 2, 5 e 6 que apresentavam os menores percentuais do composto alelopático 3,02 %, 2,26 % e 1,86 %, respectivamente, não diferiram

significativamente em relação ao tratamento controle (TC), o que não ocorreu com os outros tratamentos, os quais demonstraram o poder alelopático deste composto sobre o IVG de soja. O índice de velocidade de germinação apresentou aumento significativo nos tratamentos 1, 2, 3 com a aplicação do farelo desengordurado de *Mucuna deeringiana* e os outros tratamentos também tiverem tendência em aumentar o IVG, mas não diferenciaram da testemunha.

Centenaru et al. (2009) relataram que a aplicação do extrato etanólico de *Erythrina velutina*, uma planta pertecente à família Febaceae em sementes de *Lactuca sativa*, apresentaram melhores percentuais de IVG, como foi constato neste trabalho. Além deste, mais estudos têm relatado a produção de metabólitos por plantas e microrganismos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (PINTO et al., 2002; SINGH et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004; BATISH et al., 2006; FORTES et al., 2009).

Relacionados ao vigor de sementes, Melo et al. (2006) e Ferreira e Borghetti (2004) observaram que a velocidade de germinação e crescimento inicial das plantas está relacionada ao vigor das sementes e quanto maior o IVG, maior o vigor das sementes. No entanto, sabe-se que o crescimento é resultado da germinação e, portanto, alterações na fase de germinação poderão originar plântulas com maior índice de velocidade de germinação, justificando o estímulo da germinação de soja tratadas com solução de L-Dopa.

5. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos em relação ao presente estudo, conclui-se que:

1) O aumento da pressão e temperatura e, consequentemente, da densidade, aumenta a solubilidade do óleo no CO_2, sendo a condição experimental de 250 bar e 40 °C a que apresentou o maior rendimento em óleo, condizente com os maiores percentuais de L-Dopa. Ou seja, a extração do óleo das sementes de *Mucuna* a partir de CO_2 em condições supercríticas foi eficaz para concentrar o composto L-Dopa, uma vez que as extrações realizadas com Soxhlet e as sementes cruas apresentaram menores percentuais de L-Dopa.
2) Pela caracterização química do óleo, pode-se concluir que os diferentes processos e condições de extração não interferiram sobre o perfil dos ácidos graxos totais, sendo predominantes no óleo das sementes de *Mucuna* o ácido linoleico, palmítico e oleico. Na fração de compostos que não estão ligados ao glicerol, os ácidos graxos livres apresentaram teores abaixo de 5 % e em todos os óleos investigados os teores de ácidos graxos livres não apresentaram diferença significativa em relação aos óleos obtidos por EFS e Soxhlet.
3) O farelo desengordurado das sementes de *Mucuna*, obtidos por Soxhlet e EFS, apresentaram uma alta atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos. Porém, estes valores não apresentaram diferença significativa ao nível de 5 %, em relação às sementes cruas, indicando que os diferentes processos para a remoção do óleo não interferem na atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos das sementes de *Mucuna*. A CE_{50} foi menor para o farelo desengordurado obtido a partir de dióxido de carbono em condições pressurizadas (38,05 $\mu g\ mL^{-1}$; 20,38 $\mu g\ mL^{-1}$ e 32, 57 $\mu g\ mL^{-1}$ para *Mucuna aterrima, Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana,* respectivamente, na condição experimental 60 ° C – 176,7 bar);

4) Por meio da aplicação do farelo desengordurado de *Mucuna deeringiana* em sementes de soja, constatou-se que o percentual germinação não apresentou diferença significativa. No entanto, o índice de velocidade de germinação apresentou melhores resultados quando comparado ao tratamento controle, confirmando a interferência do composto L-Dopa em sementes de soja.
5) O modelo matemático de segunda ordem, utilizado para descrever a cinética das curvas de extração, representou adequadamente os dados experimentais para a extração com CO_2 em condições supercrítica.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros foram definidas:

a) Avaliar o efeito de outras variáveis no processo de extração supercrítica a partir do dióxido de carbono, como: vazão volumétrica do solvente, utilização de co-solventes, etc. Verificar se estas variáveis podem aumentar o rendimento de óleo e, consequentemente, o teor de L-Dopa no farelo desengordurado.

b) Avaliar o processo de extração a partir de outros solventes em condições supercríticas, como propano, butano, etc.

c) Determinar o teor de L-Dopa em outras partes da *Mucuna* como: caule, raiz, folhas, entre outros, utilizando como solvente o dióxido de carbono em condições supercríticas.

d) Estudar o efeito da aplicação do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* em plantas daninhas, como, por exemplo, a *Bidens pilosa*, avaliando os efeitos alelopáticos das mesmas.

e) Identificar e quantificar os compostos fenólicos e flavonóides no farelo desengordurado.

f) Determinar o teor de tocoferol presente no óleo extraído por extração por fluido supercrítico.

.

7. REFERÊNCIAS

ABUD, H.F.; REIS, R.G.E.; TEÓFILO, E.M. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e germinação de *Mucuna aterrima* Piper & Tracy. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p. 563-569, 2009.

ADEBOWALE, Y.A.; ADEYEMI, I.A.; OSHODI, A.A. Isolation, fractionation and characterization of proteins from *Mucuna* bean. **Food Chemistry**, v. 104, p. 287-299, 2007.

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

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebidação e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 21 – 25, nov., 2003.

AGOSTINI, K. **Ecologia da Reprodução de duas espécies de *Mucuna* (Leguminosea, Faboideae, Phaseolae) – embriologia, citogenética e variabilidade genética – do litoral do norte de São Paulo**. 2008. 178 f. Tese (doutorado) – Instituto de Biologia de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

AJAYI, I.A.; ODERINDE, R.A.; KAJOGBOLA, D.O.; UPONI, J.I. Oil content and fatty acid composition of some underutilized legumes from Nigeria. **Food Chemistry**, v. 99, p. 115-120, 2006.

ALMEIDA, A.M.R.; ABDELNOOR, R.V.; CALSO, E.S.; TESSNMAN, D.; YORINORI, J.T. Genotypic diversity among Brazilian isolates of Sclerotium rolfsii. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 1, p. 493 – 502, sep. 2001.

ALTIERI, M.A. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.93, p.1-24, 2002.

AMAROWICZ,R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 561-562, 2004.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K.M. (eds.) **International Thermodynamic Tables of the Fluid State**. Carbon Dioxide: Pergamon Press, 1976. 162p.

AQUINO, L.P.; FERRUA, F.Q.; BORGES, S.V.; ANTONIASSI, R.; CORREA, J.L.G.; CIRILLO, M.A. A influência da secagem do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) na qualidade do óleo extraído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 354-357, abr./jun., 2009.

ARIAS, M.; PENICHET, I.; YSAMBERTT, F.; BAUZA, R.; ZOUGAGH, M.; RIOS, A. Fast supercritical fluid extraction of low and high density polyethylene additives: Comparison with conventional reflux and automatic Soxhlet extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, p. 22-28, 2009.

ASEP, E.K.; JINAP, S.; TAN, T.J.; RUSSLY, A.R.; HARCHARAN, S.; NAZIMAH, S.A.H. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 450-458, 2008.

BACHMANN, T. Grassland Index: *Mucuna* **pruriens (L.) D.C. FAO/Crop and Grassland Group**. In: http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/GBASE/DATA/PF000416.HTM. Acesso em: 19/12/2011.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KAUR, S.; KOHLI, R.K. Phytotoxicity of Ageratum conyzoides residues towards growth and nodulation of Cicer arietinum.

Agriculture, Ecosystems & Environment, Chandigarh, v. 113, p. 399-401, 2006.

BELZ, R.G.; REINHARDT, C.F.; FOXCROFT, L.C.; HURLE, K. Reside allelopathy in Pathernium hysterophorus L. – Does parthenin play a leading role? **Crop Protection**, v. 26, n. 1, p. 237 – 245, june, 2005.

BERNARDO-GIL, G.B.; CASQUILHO, M.; ESQUÍVEL, M.M.; ALBERTINA, M. Supercritical fluid extraction of fig leaf gourd seeds oil: Fatty acids composition and extraction kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 49, p. 32-36, 2009.

BETANCUR-ANCONA, D.A.; CHEL-GUERRERO, L.A.; BELLO-PEREZ, L.A.; DAVILA-ORTIZ, G. Isolation of velvet bean (*Mucuna pruriens*) starch: physicochemical and functional properties. **Starch-Starke**, v. 54, p. 303-309, 2002.

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

BEUTLER, A.N.; CENTURION, J.F. Efeito do conteúdo de água e da compactação do solo na produção de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 849 – 856, jul., 2003.

BHAT, R.; SRIDHAR, K.R. Effect of electron beam irradiation on the quality characteristics of an economically valued tropical legume *Mucuna pruriens* L. DC. **Eletronic Journal of Environmental, Agricutural and Food Chemistry**, v. 7, p. 2578-2581, 2008.

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

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; OGUTU, S. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (Phaseolus spp. L.). **LWT - Food Science and Technology,** v. 41, p. 1541-1547, 2008.

BONIS, M.L.; TESSITORE, A.; PELLECCHIA, M.T.; LONGO, K.; SALVATORE, A.; RUSSO, A.; INGROSSO, D.; ZAPPIA, V.; BARONE, P.; GALLETTI, P.; TEDESCHI, G. Impaired transmethylation potential in Parkinson's disease patients treated with L-Dopa. **Neuroscience Letters,** v. 468, p. 287-291, 2010.

BONVEHÍ, J.S.; TORRENTÓ, M.S.; LORENTE, E.C. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in Honeybee-Collected pollen produced in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1848-1853, 2001.

BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Efeito alelopático de frutas de umbu (*Phytolacca dióica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1129 – 1135, set./out., 2010.

BORTOLOMEAZZI, R.; CORDARO, F.; PIZZALE, L.; CONTE, L. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2394-2401, 2003.

BORTOLINI, M.F.; FORTES A.M.T. Efeitos alelopáticos sobre a germinação de sementes de soja (Glycine Max L. Merrill). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 5 – 10, 2005.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 47, p. 21-23, 2005.

BUENO, J.R.; SAKAI, R.H.; NEGRINI, A.C.; AMBROSANO, E.J.; ROSSI, F. Caracterização química e produtividade de biomassa de quatro espécies de *Mucuna*. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 2, p. 901-904, 2007.

CARDOZO-FILHO, L. **Modelagem da extração supercrítica de óleos essenciais.** 1999. 171 f. Tese (doutorado) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

CARVALHO, I.S.; TEIXEIRA, M.C.; BRODELIUS, M. Fatty acids profile of selected *Artemisia* ssp. **Plants: Health promotion***,* v. 44, p. 293-298, 2011.

CENTENARO, C.; CORRÊA, L.G.P.; KARAS, M.J.; VIRTUOSO, S.; DIAS, J.F. G.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Contribuição ao estudo alelopático de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 304-308, 2009.

CHAMPATISINGH, D.; SAHU, P.K.; PAL, A.; NANDA, G.S. Anticataleptic and antiepileptic activity of ethanolic extract of leaves of Mucuna pruriens: A study on role of dopaminergic system in epilepsy in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, p. 197 – 199, 2011.

CHIKAGWA-MALUNGA, S.K.; ADESOGAN, A.T.; SALAWU, M.B.; SZABO, N.J.; LITTELL, R.C.; KIM, S.C.; PHATAK, S.C.; Nutritional characterization of *Mucuna pruriens* 2.*In vitro* ruminal fluid fermentability of *Mucuna pruriens*, *Mucuna* L-Dopa and soybean meal incubated with or without L-Dopa. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 51-67, 2009b.

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

CHIKAGWA-MALUNGA, S.K.; ADESOGAN, A.T.; SOLLENBERGER, L.E.; PHATAK, S.C.; SZABO, N.J.; KIM, S.C.; HUISDEN, C.M.; LITTELL, R.C. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens* 4. Does replacing soybean meal with *Mucuna pruriens* in lamb diets affect ruminal, blood and tissue L-Dopa

concentrations? **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 124-137, 2009d.

CHIKAGWA-MALUNGA, S.K.; ADESOGAN, A.T.; SZABO, N.J.; LITTELL, R.C.; PHATAK, S.C.; KIM, S.C.; ARRIOLA, K.G.; HUISDEN, C.M.; DEAN, D.B.; KRUEGER, N.A. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens* 3. Effect of replacing soybean meal with *Mucuna* on intake, digestibility, N balance and microbial protein synthesis in sheep. **Animal and Feed Science and Technology**, v. 148, p. 107-123, 2009c.

CORSO, M.P.; SILVA, E.A.; KLEN, M.R.F.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J.N.; FREITAS, L.S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 52, p. 56-61, 2010.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. Great Britain: Oxford University Press. 1975. 421p.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; NASCIMENTO, J.C.; VIEIRA, J.J. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines.* **Quimica Nova**, v. 26, p. 335-339, 2003.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO_2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DU, K.; LI, B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1181-1186, 2012.

EBIHARA, K.; ISHIDA, Y.; TAKEDA, R.; ABE, H.; MATSUO, H. KAWAI, K.; MAGATA, Y.; NISHIMORI, T. Differential expression of FosB, c-Fos, and Zif268 in

forebrain regions after acute or chronic L-Dopa treatment in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 90-94, 2011.

ERASMO, E.A.L.; AZEVEDO, W.R.; SARMENTO, R.A.; CUNHA, A.M.; GARCIA, S.L.R. Potencial de espécies utilizadas como adubo verde no manejo integrado de plantas daninhas. **Revista Planta Daninha**, v. 22, p. 337-342, 2004.

ESQUÍVEL, M.M.; BERNARDO-GIL, M.G.; KING, M.B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 16, p. 43-58, 1999.

EVANGELISTA, A.R.; ROCHA, G.P. Forragicultura. Lavras: UFLA,1998. 246p.

EZEAGU, I.E.; KRISHNA, A.G.G.; KHATOON, S. Fatty acid composition of oil from three *Mucuna* bean varieties from Nigeria – A short report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14, p. 151-152, 2005.

EZEAGU, I.E.; PETSKE, J.K.; METEGES, C.C.; AKINSOYINU, A.O. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. **Food Chemistry**, v. 78, p. 105-109, 2002.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p.175-204, 2000.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FEO, V.; SIMONE, F.; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of Ruta graveolens. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 573-578, nov., 2002.

FIORI, L.; BASSO, D.; COSTA, P. Supercritical extraction kinetics of seed oil: A new model bridging the broken and intact cells and the shrinking-core models. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 131-138, 2009.

FORTES, A.M.T.; MAULI, M.M.; ROSA, D.M.; PICCOLO, G.; MARQUES, D.S.; REFOSCO, R.M.C. Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de picão-preto e soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 241- 246, 2009.

FREITAS, G.B.; PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; BARELLA, T.P.; DINZ, E.R. **Trabalhador na olericultura básica: adubação verde**. Brasília: SENAR, 2003. 91p. (Coleção SENAR 71).

FREITAS, L.S.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C.; JACQUES, R.A.; CARAMÃO, E.B. Extraction of Grape Seed Oil Using Compressed Carbon Dioxide and Propane: Extraction Yields and Characterization of Free Glycerol Compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2558-2564, 2008.

FORMENTINI, E.A.; LÓSS, F.R.; BAYERL, M.P.; LOVATI, R.D.; BAPTISTI, E. **Cartilha sobre adubação verde e compostagem.** Incaper, 2008. 27p.

FUJII, Y. Screening and future exploitation of allelopathic plants as alternative herbicides with special reference to hairy vetch. **Journal of Crop Production**, v.4, n. 2, p. 257-275, 2001.

FURLANETTO, C.; DAVI, J.J.S.; GRABOWSKI, M.M.S.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; LAYTER, N.A.; SEIFERT, K.E. Reação de adubos verdes de verão ao nematóide *Tubixaba taxaua*. **Tropical Plant Pathology**, v. 6, p. 403-408, 2008.

FURUBAYASHI, A.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. Role of catechol structure in the adsorption and transformation reactions of L-Dopa in soils. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 239-250, 2007.

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

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de Aristolochia esperanzae O. Kuntze na germinação e no crescimento

de Lactuca sativa L. e Raphanus sativus L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 459-472, 2004.

GIROLAMI, U.D. O sistema nervosa central. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (eds.). **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1171 – 1224, 1996.

GLEW, R.H.; KRAMER, J.K.; HERNANDEZ, M.; PASTUSZYN, A.; ERNST, J.; DJOMDI, N.N.; VANDERJAGT, D.J. The amino acid, mineral and fatty acid content of three species of human plant foods in Cameroun. **Food**, v. 4, p. 1-6, 2010.

GLUECKAUF, E.; COATES, J.J. Theory of chromatography. Part IV: The influence of incomplete equilibrium on the front boundary of chromatograms and on the effectiveness of separation. **Journal of the Chemical Society**, v. 3, p.1315-1947, 1947.

GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito alelopático de extratos de Nicotiana tabacum e Eucalyptus grandis sobre a germinação de três espécies de hortaliças. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 43 – 50, jan./mar., 2004.

GOLISZ, A.; SUGANO, M.; HIDRATE, S.; FUJII, Y. Microarray analysis of *Arabidopsis* plants in response to allelochemical L-Dopa. **Planta**, v. 233, p. 231-240, 2011.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 26, p. 401-407, 1993.

GOTO, M.; ROY, B.C.; HIROSE, T. Shrinking-core leaching model for supercritical-fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 9, p. 128-133, 1996.

GUERRANTI, R.; AGUIYI, J.C.; ERRICO, E.; PAGANI, R.; MARINELLO, E. Effects of *Mucuna pruriens* extract on activation of prothrombin by *Echis carinatus* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 175-180, 2001.

GÜLÇIN, I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. **Amino Acids**, v. 32, p. 431-438, 2007.

GURUMOORTHIA, P.; JANARDHANANB, K.; MYHRMANC, R.V. Effect of differential processing methods on L-Dopa and protein quality in velvet bean, an underutilized pulse. **LWT**, v. 41, p. 588–596, 2008.

HAN, C.M.H.; PAN, K.W.; WU, N.; QUANG, J.C.; LI, W. Allelopathic effect of ginger on seed germination seedling growth of soybean and chive. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 1, p. 330 – 336, jan., 2008.

HARTKAMP, A.D.; HOOGENBOOM, G.; GILBERT, R.A.; BENSON, T.; TARAWALI, S.A.; GIJSMAN, A.J.; BOWEN, W.; WHITE, J.W. Adaptation of the CROPGRO growth model to velvet bean (*Mucuna pruriens*). II. Cultivar evaluation and model testing. **Field Crops Research**, v.78, p.27-40, 2002.

HOLSER, R.A.; BOST, G.; BOVEN, M.V. Phytosterol composition of hybrid *Hibiscus* seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2546-2548, 2004.

HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N.; OKOGUN, A.; VANLAUWE, B.; MERCKX, R.; VAN CLEEMPUT, O. Assessment of soil factors limiting growth and establishment of *Mucuna* in farmers'fields in the derived savanna of the Benin republic. **Biology and Fertility of Soil**, v.33, p. 416-422, 2001.

HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N.; WOOMER, P.; VANLAUWE, B.; VAN CLEEMPUT, O. Response of *Mucuna pruriens* to symbiotic nitrogen fixation by rhizobia following inoculation in farmers' fields in the derived savanna of Benin. **Biology and Fertility of Soil**, v.30, p. 558 – 565, 2000.

HU, J.N.; ZHANG, B.; ZHU, X.M.; LI, J.; FAN, Y.W.; LIU, R.; TANG, L.; LEE, K.T.; DENG, Z.Y. Characterization of Medium-Chain Triacyglycerol (MCT) – Enriched seed oil from *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) and Its oxidative stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* v. 59, p. 4771-4778, 2011.

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

INGLE, P.K. L-Dopa bearing plants. **Natural Product Radiance**, v. 2, p. 126-133, 2003.

JAUNARAJS, K.L.E.; ANGOA-PEREZ, M.; KUHN, D.M.; BISHOP, C.; Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: Consequences of L-Dopa treatment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 556-564, 2011.

KRIS-ETHERTON, P.M.; TAYLOR, D.S.; YU-POTH, S.; HUTH, P.; MORIARTY, K.; FISHEL, V.; HARQROVE, R.L.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 179-88, 2000.

KUMAR, D.S.; MUTHU, A.K.; SMITH, A.A.; MANAVALAN, R. In vitro Antioxidant Activity of Various Extracts of whole Plant of *Mucuna pruriens* (Linn). **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, p. 2063-2070, 2010.

LAMEIRA, C.P.; COELHO, G.L.V.; MOTHÉ, C.G. Extração de lipídeos de amêndoa de castanha de caju com CO_2 supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 10-17, 1997.

LANG, Q.; WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.

LIPSKI, J.; NISTICO, R.; BERRETTA, N.; GUATTEO, E.; BERNARDI, G.; MERCURI, N.B. L-Dopa: A scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? **Progress in Neurobiology**, v. 94, p. 389-407, 2011.

LONGHI, J.G.; PEREZ, E.; LIMA, J.J.; CÂNDIDO, M.B. In vitro evaluation of *Mucuna* pruriens (L.) DC. antioxidant activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 535-544, 2011.

MACHUKA, J. Characterization of the seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria. **Food Chemistry**, v. 68, p. 421 – 427, 2000.

MACIEL, G.M.; SILVA, E.C.; LANDGRAF, P.R.C. Superação da dormência imposta pela impermeabilidade do tegumento em sementes de *Mucuna preta.* **Biosciense Journal**, v. 26, p. 724-731, 2010.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p. 176-177, jan., 1962.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v. 30, p. 547-555, 2006.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINEZ, J.; MONTEIRO, A.; ROSA, P.; MARQUES, M.; MEIRELES, M. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MELO, P.T.B.S.; BRAGASCHUCH, L.O.; ASSIS, F.N.; CONCENÇO, G. Comportamento individual de plantas originadas de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica em população de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 84-94, 2006.

MELO, S.A.B.V.; MELO, R.L.F.V.; COSTA, G.M.N.; ALVES, T.L.M. Solubility of L-Dopa in supercritical carbon dioxide: prediction using a cubic equation of state. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 231-236, 2005.

MHEMDI, H.; RODIER, E.; KECHAOU, N.; FAGES, J. A supercritical tuneable process for the selective extraction of fats and essential oil from coriander seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 609-616, 2011.

MIN, J.; LI, S.; HAO, J.; LIU, N. Supercritical CO_2 extraction of Jatropha oil and solubility correlation. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, p. 3755-3758, 2011.

MIRA, B.; BLASCO, M.; SUBIRATS, S. Supercritical CO_2 extraction of essential oils from Orange Peel. The Journal of Supercritical Fluids, v. 9, p. 238-246, 1996.

MODI, K.P.; PATEL, N.M.; GOYAL, R.K. Estimation of L-Dopa from *Mucuna pruriens* Linn and formulations containing *M. pruriens* by HPTLC method. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, p. 357 – 359, 2008.

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

NAGY, B.; SIMANDI, B. Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 293–298, 2008.

NAUTIYAL, O.P.; TIWARI, K.K. Extraction of Dill seed oil (Anethum sowa) using supercritical carbon dioxide and comparison with hydrodistillation. **Industrial & Enginneering Chemistry Research**, v. 50, p. 5723-5726, 2011.

NAVAILLES, S.; BIOULAC, B.; GROSS, C.; DEURWAERDÈRE, P. Chronic L-Dopa therapy alters central serotonergic function and L-Dopa induced dopamine

release in a region-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 41, p. 585-590, 2011.

NIMET, G.; SILVA, E.A.; PALÚ, F.; DARIVA, C.; FREITAS, L.S.; NETO, A.M.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus L*.) oil with supercritical CO_2 and subcritical propane: Experimental and modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 262-268, 2011.

NOMOTO, M.; NISHIKAWA, N.; NAGAI, M.; YABE, H.; NAKATSUKA, A.; MORITOYO, H.; MORITOYO, T.; KUBO, M. Inter- and intra-individual variation in L-Dopa pharmacokinetics in the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, p. S21-S24, 2009.

OMODE, A.A.; FATOKI, O.S.; OLAOGUN, K.A. Physicochemical properties of some under-exploited and non-conventional oil seeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2850–2853, 1995.

ONYEIKE, E.N.; ACHERU, G.N. Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts. **Food Chemistry**, v. 77, p. 431–437, 2002.

PASTOR-CAVADA, E.; JUAN, R.; PASTOR, J.E.; ALAIZ, M., VIOQUE, J. Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild Lathyrus species from South Spain. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, p. 705-709, 2009.

PEDERSSETTI, M.M.; PALÚ, F.;k SILVA, E.A.; ROHLING, J.H.; CARDOZO-FILHO, L.; DARIVA, C. Extraction of Canola Seed (*Brassica napus*) Oil using Compressed Propane and Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 189-196, 2010.

PEREZ, E. **Obtenção de extrato padronizado de *Mucuna pruriens* (l.) dc. e controle de qualidade de matéria-prima e produto contendo *boswellia serrata* roxb.: desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por**

CLAE. 2009. 153 f. Tese (doutorado) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PERRUT, M.; CLAVIER, J.Y.; POLETTO, M.; REVERCHON R. Mathematical modeling of sunflower seed extraction by supercritical CO_2. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 430-435, 1997.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis – **Review. Journal of Chromatography A**, v. p. 1163, 2-24, 2007.

PRAKASH, D.; NIRANJAN, A.; TIWARI, S. K. Some nutritional properties of the seeds of three *Mucuna* species. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 52, p. 79-82, 2001.

PRAKASH, D.; UPADHYAY, G.; SINGH, B.N.; SINGH, H.B. Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). **Food Chemistry,** v. 104, p. 783-790, 2007.

QIZHEN, D.; LI, B. Identification of antioxidant compounds of Mucuna sempervirens by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1181 – 1186, 2012.

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

RANDHIR, R.; KWON, Y.I.; SHETTY, K. Improved health-relevant functionality in dark germinated *Mucuna* pruriens sprouts by elicitation with peptide and phytochemical elicitors. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4507-4514, 2009.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Antioxidant enzyme response studies in H_2O_2 stressed porcine muscle tissue following treatment with fava bean sprout extract and L-DOPA. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 671-698, 2006.

RANDHIR, R.; SHETTY, K. Microwave-induced stimulation of L-Dopa, phenolics and antioxidant activity in fava bean (Vicia faba) for Parkinson's diet. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1775-1784, 2004.

RECASENS, F.; McCOY, B.J.; SMITH, J.M. Desorption processes: supercritical fluid regeneration of activated carbon. American **Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 35, p. 951-958, 1989.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO_2 extraction of vegetable oils. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 161-175, 2001.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Supercritical Extraction of Clove Bud Essential Oil: Isolation and Mathematical Modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 3421-3428, 1997.

RICE, E.L. Allelopathy: Academic Press Inc. 1984. In: WALLER, G.R. (ed.) **Allelochemical, role in agriculture and forestry**. Eashington: American Chemical Society, 1987. p. 7-22. (ACS. Sympossium Series, 330).

RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B.M. Potencial alelopático de Mimosa caesalpinaefolia Benth sobre sementes de Tabebuia alba (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 130-136, 2001.

RODRIGUES, M.R.A.; KRAUSE, L.C.; CARAMÃO, E.B.; SANTOS, J.G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO_2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3042-3047, 2004.

RODRIGUES, M.R.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C.; CARAMÃO, E.B.; SANTOS, J. G. The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high pressure CO_2 extraction of *Majorana hortensis* Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 453-456, 2003.

RODÍGUEZ-KÁBANA, R.; PINOCHET, J.; ROBERTSON, D.G.; WELS, L.L. Crop rotation studies with velvet bean (*Mucuna* deeringiana) for the manangement of Meloidogyne spp. **Journal of Nematology**, v. 24, p. 662-668, 1992.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S.; KARIM, A.A.; ABBAS, K.A.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Application of supercritical CO_2 in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240-253, 2009.

SANTOS, M.R.A.; FERREIRA, M.G.R.; CARVALHO, J.O.M.; MARCOLAN, A.L.; BARROSO, G.R.P.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G. Efeito da adubação verde sobre o crescimento de *Kalanchoe pinnata* (lam.) pers. **Saber Científico**, v. 2, p. 45-55, 2009.

SANTOS, S. **Potencial alelopático e avaliação sistêmica de compostos secundários em extratos provenientes de *Canavalia Ensiformis* utilizando eletroforese capilas.** 2004. 185 f. Tese (doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

SATHIYANARAYANAN, L.; ARULMOZHI, S. *Mucuna pruriens* Linn. – A comprehensive review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 157-162, 2007.

SCIRÈ, A.; TANFANI, F.; BERTOLI, E.; FURLANI, E.; NNADOZIE, H.P.; CERUTTI, H.; CORTELAZZO, A.; BINI, L.; GUERRANTI, R. The belonging of

gpMuc, a glycoprotein from *Mucuna pruriens* seeds, to the Kunitz-type trypsin inhibitor family explains its direct anti-snake venom activity. **Phytomedicine**, v. 18, n. 887-895, 2011.

SEÑORÁNS, F.J.; IBAÑEZ, E. Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 131-144, 2002.

SHUKLA, S.; METHA, A.; JOHN, J.; SINGH, S.; MEHTA, P.; VYAS, S.P. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of Caesalpinia bonducella seeds. **Food Chemical and Toxicology**, v. 47, p. 1848-1851, 2009.

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.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Reviews International**, v. 20, p. 77-90, 2004.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; PANDHER, J.K.; KOHLI, R.K. Phytotoxic effects of Parthenium hysterophorus residues on three Brassica species. **Weed Biology and Management**, v. 5, p. 105-109, 2005.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

SOARES, A.R.; FERRARESE, M.L.L.; SIQUEIRA-SOARES, R.C.; MARCHIOSI, R.; FINGER-TEIXEIRA, A.; FERRARESE-FILHO, O. The allelochemical L-Dopa increases melanin production and reduces reactive oxygen species in soybean roots. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 891-989, 2011.

SOARES, A.R. **Lignificação de raízes de soja sob ação de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-Dopa).** 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado). Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SOARES, E.S. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, A.T.; BENAZZI, T.L.; GRINGS, M.B.; CABRAL, V.; SILVA, E.A.; CARDOZO-FILHO, L.; ANTUNES, A.C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 182-187, 2008.

SOUZA, I.F.; FURTADO, D.A.S. Caracterização de aleloquimicos do centeio (Secale cereale) e seu potencial alelopático sobre plantas de alface (*Lactuca sativa*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1097-1099, 2002.

SOVOVÁ, H. Rate of the Vegetable Oil Extraction With Supercritical CO_2 – I. Modelling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 35-52, 2005.

SPENCER, J.P.; JENNER, A.; BUTLER, J.; ARUOMA, O.I.; DEXTER, D.T.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. Evaluation of the prooxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 24, p. 95-105, 1996.

STUART, L.A.; MACLACHLAN, J.; MCNAUGHTAN, A. Compounds of Agricultural Significance Using Environmental Analytical Supercritical Fluid Extraction - A Review. **Analyst**, vol. 121, p. 11R-28R, 1996.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I.A.; GARBELOTTI, M.L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil. **Revista Instituto Adolf Lutz,** v. 60, p. 113-117, 2001.

TAN, C., LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions, **AIChE**, v. 3, p. 1029-1989, 1989.

TAYLOR, L.T. **Supercritical Fluid Extraction.** New York: John Wiley & Sons, Inc., v. 103, p. 4-34, 1996.

TEIXEIRA, C.M.; ARAÚJO, J.B.S.; CARVALHO, G.J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 691-695, 2004.

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.

TOKURA, L.K.; NÓBREGA, L.H.P. Alelopatia de cultivos de cobertura vegetal sobre plantas infestantes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, p. 379-383, 2006.

TRIPATHI, Y.B.; UPADHYAY, A.K. Antioxidant property of *Mucuna* pruriens Linn. **Current Science**, v. 80, p. 1377–1378, 2001.

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.

VADIVEL, V.; STUETZ, W.; SCHERBAUM, V.; BIESALSKI, H.K. Total free phenolic content and health relevant functionality of Indian wild legume grains: Effect of indigenous processing methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 935-943, 2011.

VALDÉS, S.T.; COELHO, C.M.M.; MICHELLUTI, D.J.; TRAMONTE, V.L.C.G. Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2104-2111, 2011.

VARGAS-AYALA, R.; RODRIGUES-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G.; McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Shifts in soil microflora induced by velvet bean (Mucuna deeringiana) in cropping systems to control root-knot nematodes. **Biological Control**, v.17, n. 1, p.11-22, jan., 2000.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide**. Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246-254, 2009.

WALKER, R.E. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society** (Method AOCS Ce 2-66) (4th). Champaign: American Oil Chemists Society, 1990.

YAMINI, Y.; ASGHARI-KHIAVI, M.; BAHRAMIFAR, N. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets. **Talanta**, v. 58, p. 1003-1010, 2002.

YUAN, H.Q.; KONG, F.; WANG, X.L.; YOUNG, C.Y.F.; HU, X.Y.; LOU, H.X. Inhibitory effect of acetyl-11-keto-boswellic acid on androgen receptor by interference of Sp1 binding activity in prostate cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 11, p. 2112–2121, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

No apêndice A é apresentado os cromatogramas obtidos a partir da curva de calibração do padrão de L-Dopa (L - 3,4-Dihidroxifenilalanina) e o cromatograma da condição experimental que apresentou o maior percentual de L-Dopa no farelo desengordurado a partir da EFS. - Sigma-Aldrich. A curva de calibração foi realizada em HPLC.

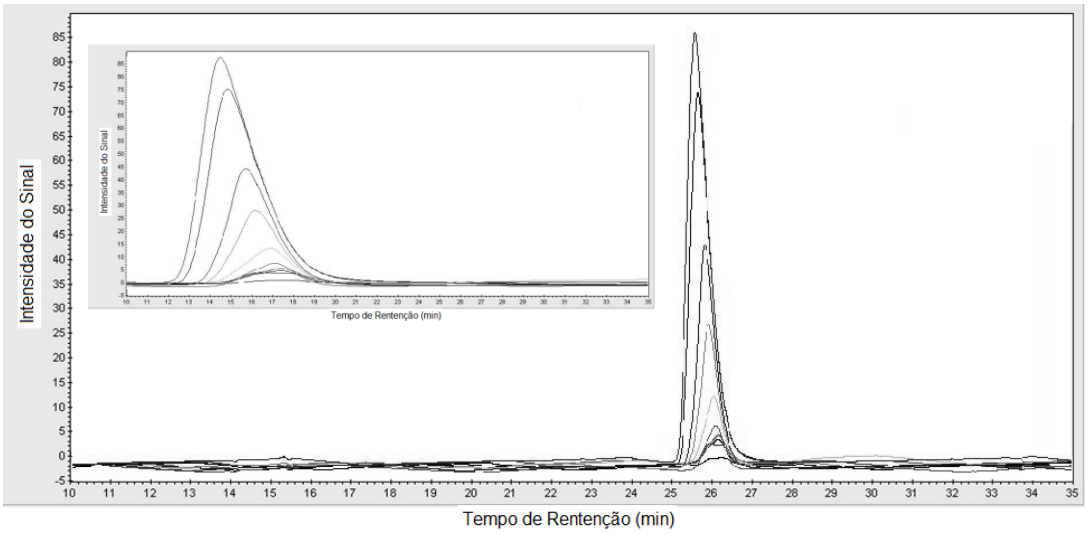


Figura A.1. Cromatogramas obtidos a partir do padrão de L-Dopa (L - 3,4-Dihidroxifenilalanina).

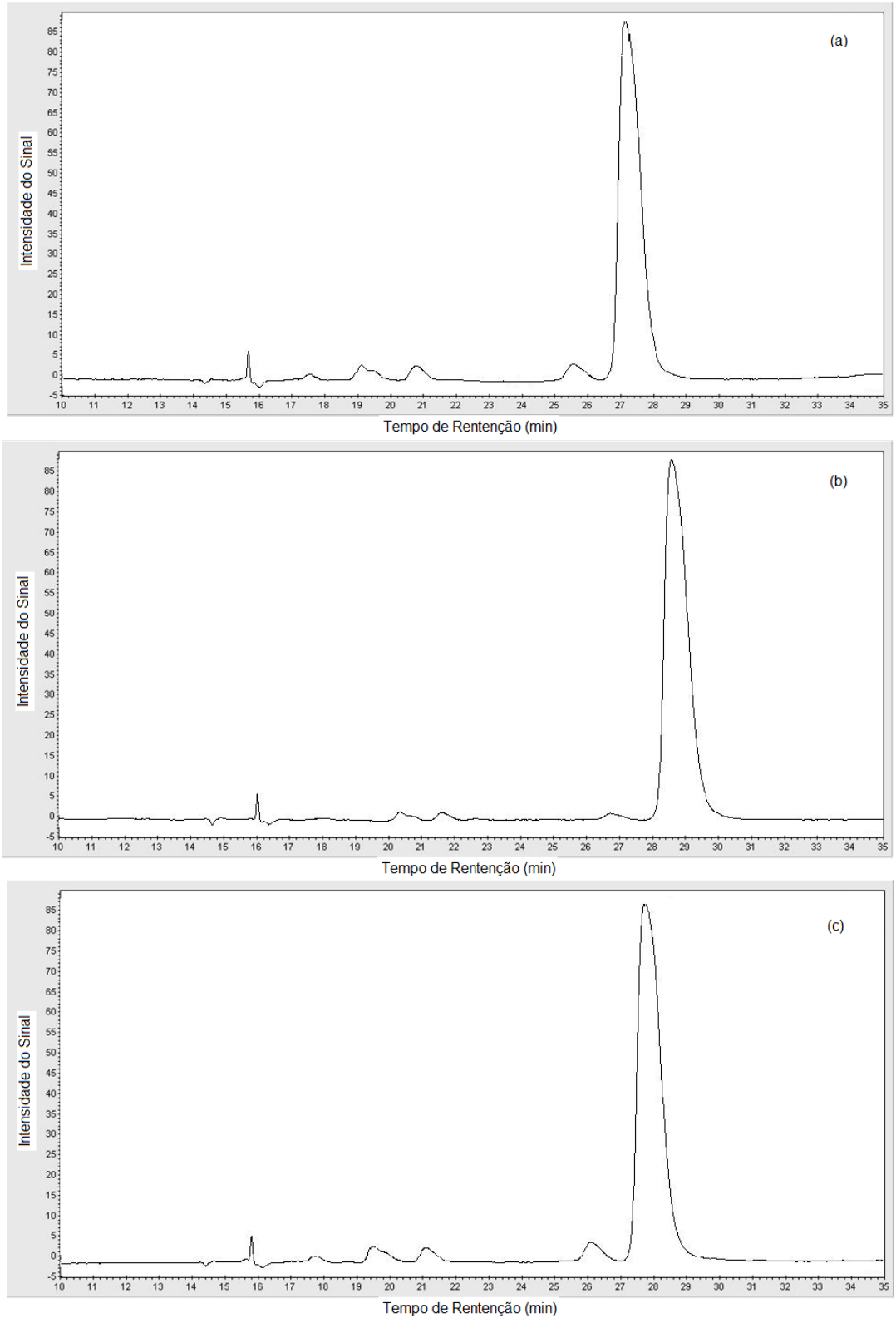


Figura A.2. Cromatogramas do óleo das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C – 250 bar. (a) *Mucuna aterrima*; (b) *Mucuna cinerium* e (c) *Mucuna deeringiana*.

APÊNDICE B

No apêndice B, são apresentados os resultados experimentais obtidos neste estudo referente a atividade antioxidante (consumo de DPPH) do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* das variedades *Mucuna aterrima*, *Mucuna cinerium* e *Mucuna deeringiana* obtidos a partir dos solventes dióxido de carbono em condições supercríticas, diclorometano e hexano.

Nas Figuras B-1 a B-7 são apresentados os resultados obtidos experimentalmente para o consumo de DPPH em diferentes concentrações.

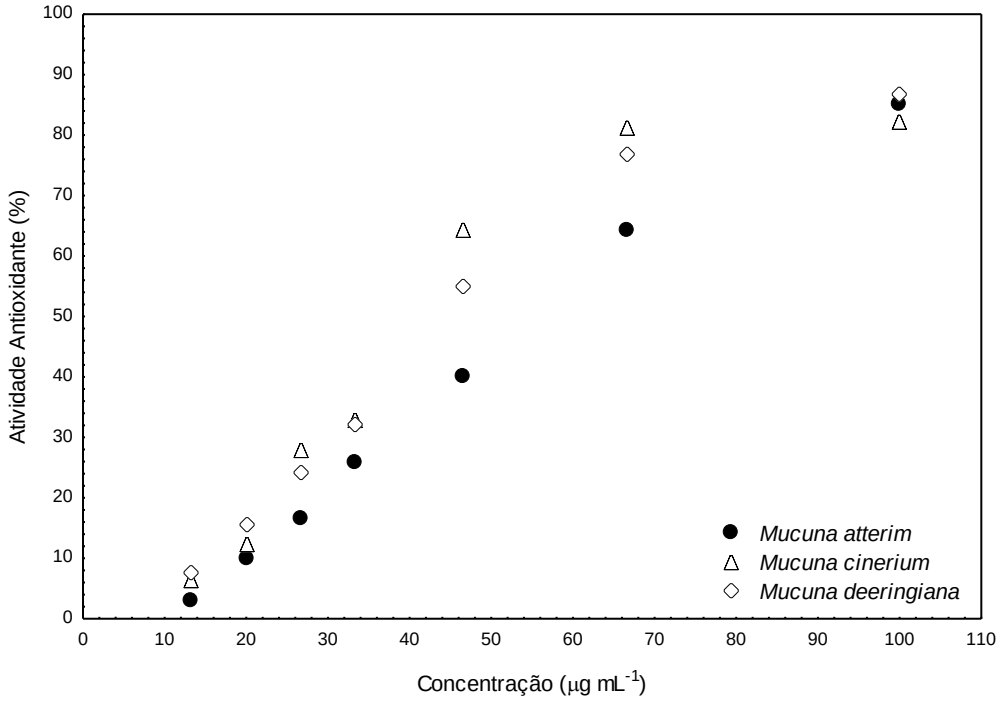


Figura B.1. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* cruas.

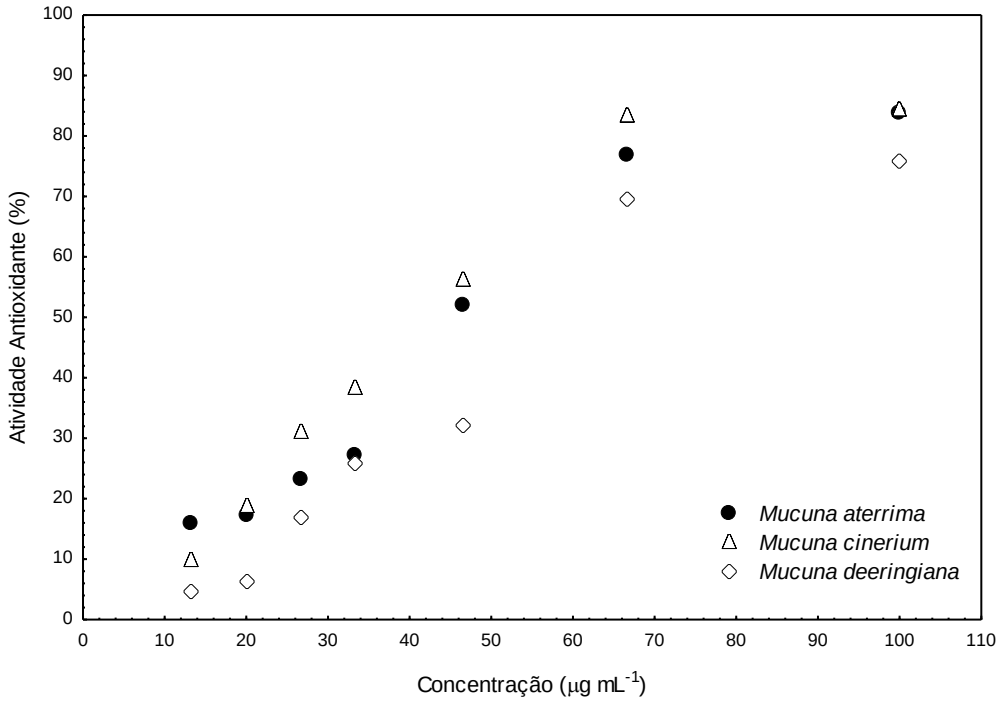


Figura B.2. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C - 150 bar.

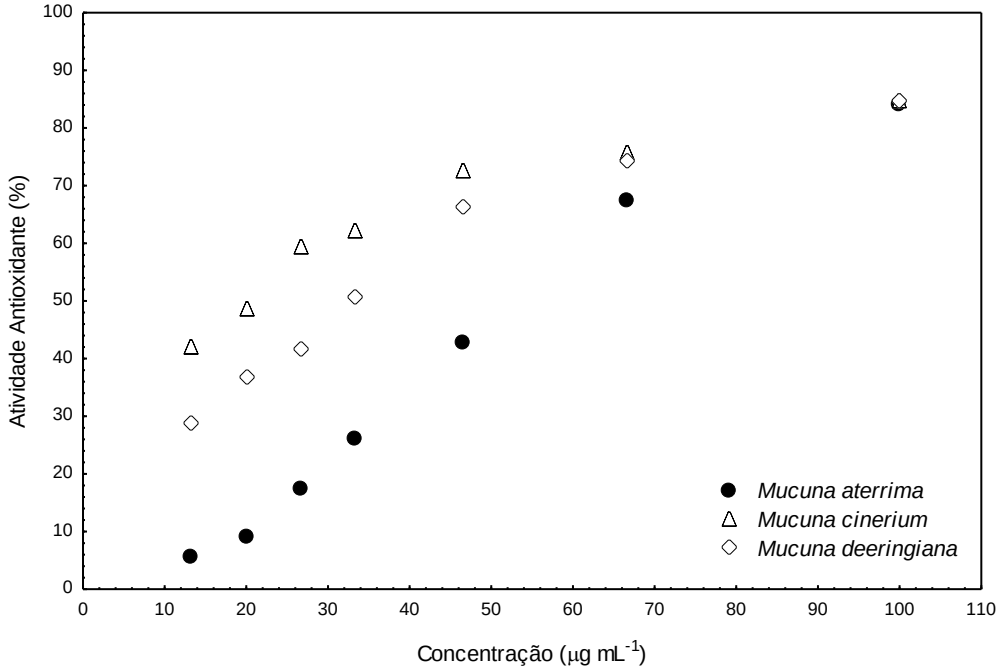


Figura B.3. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 60 °C - 176,7 bar.

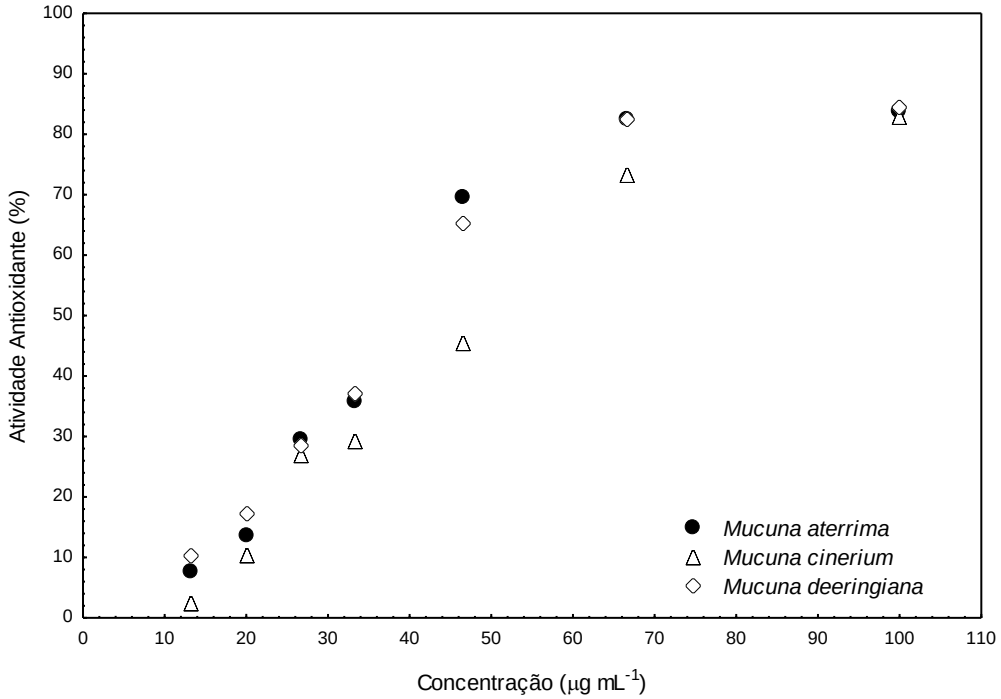


Figura B.4. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 60 °C - 244,1 bar.

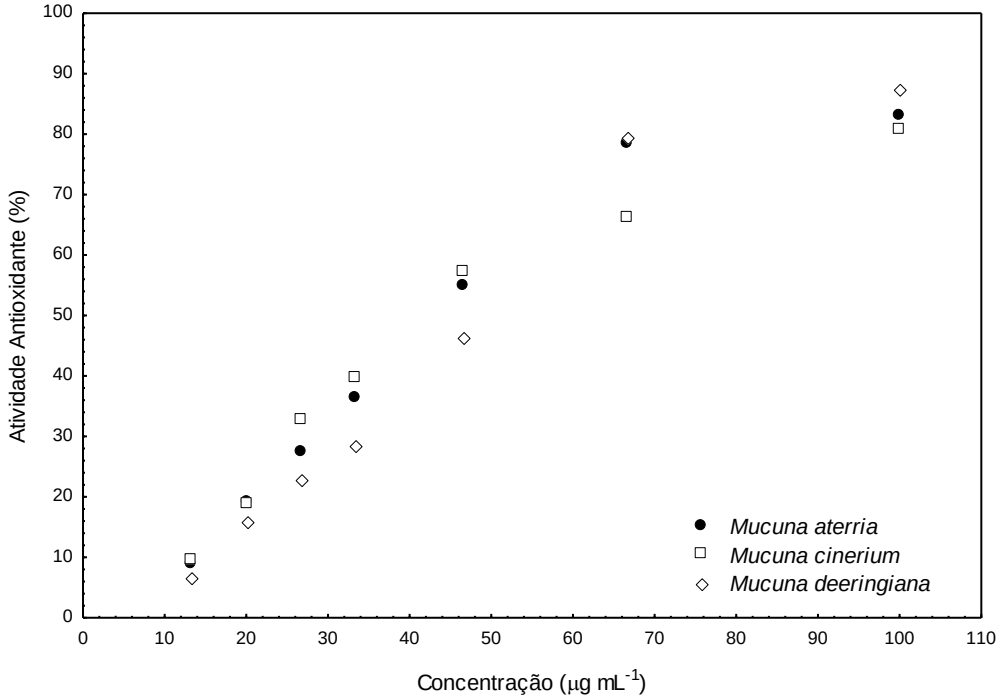


Figura B.5. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidas a partir de dióxido de carbono em condições supercríticas na condição experimental 40 °C - 250 bar.

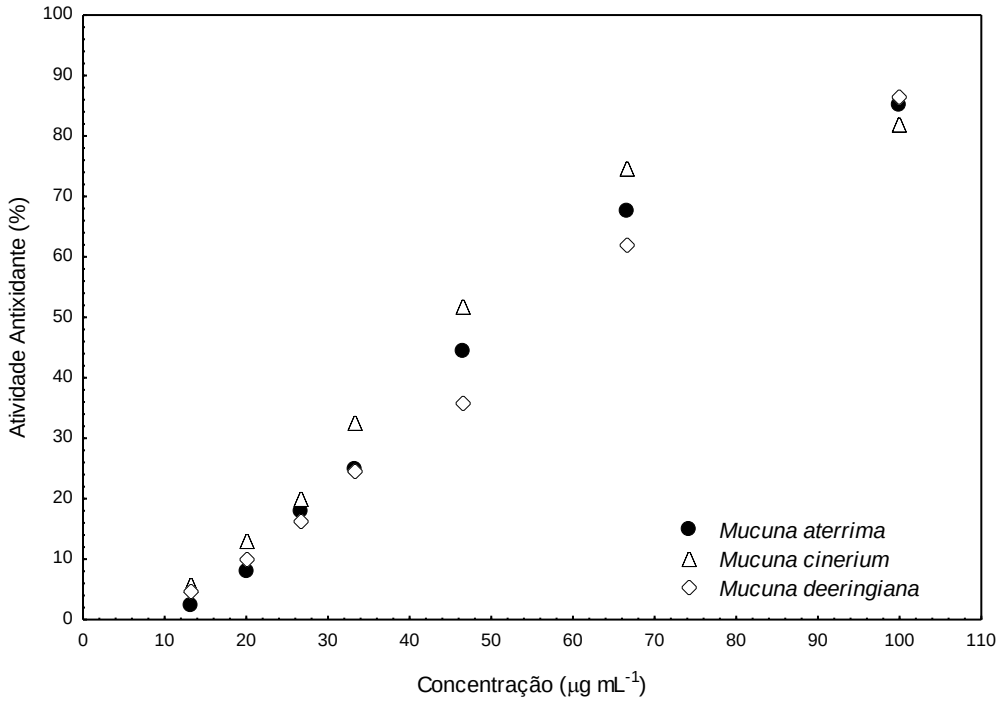


Figura B.6. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos por solventes orgânicos (diclorometano).

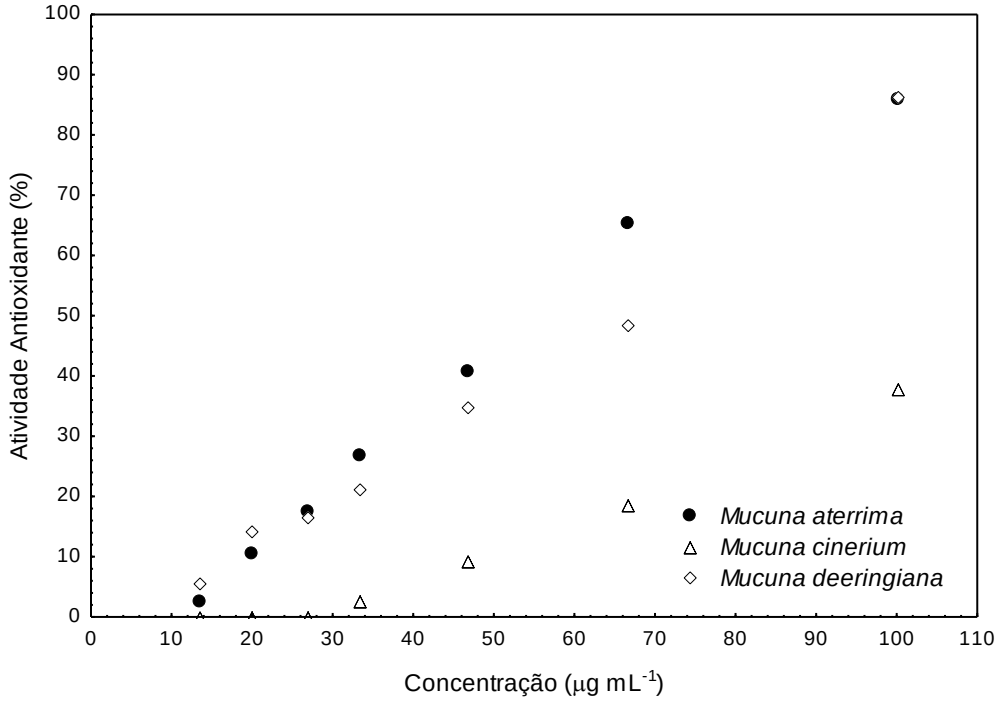


Figura B.7. Atividade antioxidante do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna* obtidos por solventes orgânicos (hexano).