

Otimização do método extração de compostos fenólicos totais em sementes de *Mucuna pruriens* (L.) DC.

Optimization of extraction of total phenolics compounds from seeds of Mucuna pruriens (L.) DC.

Sheila Negrini Parmezan¹, Lílian Klein², Brás Heleno Oliveira³, Fernanda Bovo^{4*} Elisa Perez⁵

¹ Mestre. UNIFESP; ² Mestre. UNICENTRO; ³ Professor. UFPR; ⁴ Doutoranda. UFPR. ⁵ Professora. UNICENTRO

Resumo

Introdução: plantas do gênero *Mucuna* são usadas para o tratamento do Mal de Parkinson em muitos países. Estas ações farmacológicas são associadas à presença de levodopa e de compostos fenólicos, que auxiliam no potencial antioxidante da droga. **Objetivo:** otimizar um método eficiente para o preparo de amostra a fim de quantificar a concentração de fenólicos totais (TP) em três variedades de sementes de *M. pruriens* pelo método de Folin-Denis. **Metodologia:** sementes de três variedades de *M. pruriens* L. foram usadas. Foi utilizado planejamento fatorial 2⁴ com ponto central (n=3) e as variáveis foram: tipo do líquido extrator; presença de HCl ou ausência; tipo de extração e tempo de extração. **Resultado:** o preparo de amostra otimizado resultou em extração com água acidificada com HCl 1,14 M em vórtex por 5 min. O teor de TP foi 2,971 ± 0,143 mg de ácido 3-hidroxycinnâmico (3-HC) % (var. cinza), 2,916 ± 0,093mg 3-HC % (var. preta) e 2,588 ± 0,120 mg 3-HC % (var. verde) em relação ao pó da semente. **Conclusão:** o método de extração foi otimizado para as condições de agitação de 5 min. em vórtex com HCl 1,14M. As variáveis significativas com efeito de primeira ordem foram água como líquido extrator na presença de HCl 1,14 M, para a extração de fenólicos totais em *M. pruriens* (L.) DC.

Palavras-chaves: *Mucuna*. Planejamento. Mal de Parkinson.

ABSTRACT:

Introduction: plants of the genus *Mucuna* are used for the treatment of Parkinson's disease in many countries. This pharmacological property has been related to the presence of levodopa and phenolics which may also be involved with the potential antioxidant. **Objective:** optimize an efficient method for sample preparation in order to quantify the concentration of total phenolics (TP) in three varieties of *M. pruriens* seeds by the Folin-Denis method. **Methodology:** seeds of three varieties of *M. pruriens* L. were used. It was used a Factorial design 2⁴ with center point (n = 3) and the variables were: type of extraction liquid; presence or absence of HCl; type of extraction and extraction time. **Resulting:** The optimized sample preparation resulted in the extraction of water acidified with 1.14 M HCl for 5 min in vortex. The PT content was 2.971 ± 0.143 mg of 3-hydroxycinnamic acid (3-HC)% (var. Gray), 0,093mg ± 2.916% HC-3 (var. Black), and 2.588 ± 0.120 mg% HC-3 (var. green) in relation to the seed powder. **Conclusion:** the extraction method was optimized for the 5 min stirring conditions in vortex with 1.14M HCl. The significant variables with first order effect were water as extracting liquid in the presence of 1.14 M HCl for the extraction of phenolic compounds in *M. pruriens* (L.) DC.

Keywords: *Mucuna*. Planning. Parkinson disease.

INTRODUÇÃO

A espécie *Mucuna pruriens* (L.) DC. (Fabaceae), conhecida popularmente como café berão e pó de mico, tem suas propriedades medicinais amplamente divulgadas em países asiáticos, especialmente a Índia. É uma espécie nativa de países tropicais, tais como a Índia, África e Ilhas do Pacífico, mas também ocorre no Brasil, sendo encontrada nas regiões da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (MOTTA; PINTO, SCIO, 2012; RAJESHWAR et al., 2005; SMIT et al., 1995; TOZZI; AGOSTINI; SAZIMA, 2005).

Segundo Hussain e Manyam (1997) as sementes de *M. pruriens* L. contém aproximadamente 4 % de levodopa, princípio ativo utilizado para o tratamento Mal de

Parkinson (MP) e, em análise de mais de 1000 espécies dentre 135 famílias, o gênero *Mucuna* foi considerado a melhor fonte de levodopa em sementes para uso comercial (WICHERS et al., 1993).

Além de levodopa, outros compostos básicos foram encontrados em folhas de *M. pruriens*, como o derivado indol-3-alquilamínico N,N-dimetiltriptamina, compostos catecólicos como isoquinolinas, entre outros (GHOSAL; SINGH; BHATTACHARYA, 1971) fenólicos (MOTTA et al., 2013).

Em sementes de *M. mutisiana* foi isolada a L-3-carboxi-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (BELL; NULU, 1971) e tetraidroisoquinolinas de *M. pruriens* (MISRA; WAGNER, 2004). Já o extrato etanólico obtido a quente do caule de *M. cinerea* apresentou prunetina e genisteína (DEMUNER et al., 2003). Essas substâncias pertencem à classe dos polifenóis, que são compostos de

Correspondente/Corresponding: *Fernanda Bovo – End.: Rua Pedro Scherer Sobrinho, 260 Curitiba – PR – Tel: (42) 99932-3101 E-mail: fernanda_bovo@yahoo.com.br

grande diversidade de estruturas, possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

As substâncias fenólicas podem se apresentar livres ou na forma de glicosídeos. A posição do açúcar na estrutura fenólica interfere em várias propriedades desses compostos, tais como capacidade de dissolução, ionização e em outras propriedades físico-químicas. Estas diferenças podem ser importantes no desenvolvimento de métodos de separação e quantificação desse grupo de substâncias. Os compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos apresentam potentes propriedades antioxidantes, pois mesmo em baixas doses são capazes de intervir no stress oxidativo e prevenir danos à saúde (ANTOLOVICH et al., 2000; BADIALE-FURLONG et al., 2003; CRUZADO et al., 2013).

Os polifenóis são amplamente encontrados nos vegetais, e dentre os compostos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais, encontram-se fenólicos simples, xantonas, flavonóides, ligninas, taninos, entre outros (CARVALHO; GOSMAN; SCHENKEL, 2004). Os polifenóis são oriundos do metabolismo secundário de vegetais, assim são importantes elementos para o seu crescimento e reprodução, vegetais, além disso, são conhecidos por seu potencial antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007; CARVALHO; GOSMAN; SCHENKEL, 2004; NACZK; SHAHIDI, 2004). Essas evidências sugerem que doenças causadas pelas reações oxidativas podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais, como é o caso do MP (CARVALHO; GOSMAN; SCHENKEL, 2004).

A determinação da concentração compostos fenólicos totais em extratos vegetais é um ensaio bastante valorizado pela literatura indexada, uma vez que a concentração desse grupo de substâncias pode estar correlacionado com várias atividades biológicas dos vegetais, tais como a atividade antioxidante, anti-inflamatória entre outras atividades biológicas (CRUZADO et al., 2013; MOTTA et al., 2013).

O método de Folin-Denis, largamente utilizado para a quantificação de fenóis totais, baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm (FUNARI; FERRO, 2006). Nesse contexto, ferramentas laboratoriais que otimizem a extração desses compostos em extratos vegetais são de alta aplicabilidade, tanto no contexto de pesquisa, acadêmico, bem como da indústria fitoterápica.

A análise de extrações otimizadas em compostos vegetais por diferentes metodologias é uma importante ferramenta para estudos que visam a obtenção de um produto vegetal ou extratos vegetais altamente concentrados em substâncias ou grupos de substâncias específicas, uma vez que a modificação quantitativa ou qualitativa das variáveis do processo extrativo, tais como solvente,

tempo de extração, modo de extração, entre outras podem resultar em diferentes concentrações de compostos vegetais. Para atingir a extração ótima de um determinado composto, com o mínimo de experimentos, a ferramenta do planejamento fatorial mostra-se extremamente útil, em virtude de possibilitar a otimização de metodologias e por considerar vários níveis das variáveis críticas, avaliando seus efeitos e possíveis interações de fatores nas respostas desejadas (SOUZA et al., 2009).

A otimização de experimentos químicos e biológicos é realizada, na maioria das vezes, de forma univariada, método onde avalia-se somente uma variável por vez. Porém, essa forma de avaliação pode não refletir a total eficiência dos métodos, uma vez que não tem a capacidade de avaliar efeitos de sinergismo ou interações entre vários métodos concomitantes (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). Atualmente, técnicas envolvendo otimização multivariada vêm sendo aplicadas em estudos analíticos por permitirem, dentre outras vantagens, a otimização simultânea de vários fatores envolvidos no sistema com menor número de experimentos, maior rapidez e principalmente indicar condições ótimas para obtenção dos melhores resultados (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Para a realização de um planejamento fatorial (PF) a combinação de k fatores é investigada em y níveis, assim um PF consistirá de y^k experimentos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Neste trabalho, procurou-se obter, por meio do PF, qual o melhor método para se preparar amostras visando extrair e quantificar fenólicos de variedades de *M. pruriens*.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Foram utilizadas três sementes de *Mucuna pruriens* (L.) DC., Fabaceae, variedade preta, verde e cinza, fornecidas pelo Instituto de Agronomia do Paraná (IAPAR) de Londrina. O trabalho foi realizado utilizando-se o pó das sementes moídas na empresa Steviafarma Industrial, na granulometria inferior a 0,250 mm. As sementes foram previamente secas em estufa 60 °C e a massa seca obtida foi em torno de 92±2%.

Insumos e Reagentes

Para realizar a curva de calibração foi usado como padrão o ácido 3-hidroxicinâmico (3-HC) (Sigma-Aldrich).

Tanto para a realização da curva de calibração, quanto para a quantificação de fenólicos foi preparado o reativo de Folin e Denis (1912).

Os aparelhos utilizados foram: Espectrofotômetro Shimadzu, mod. UV-2401PC, UV-vis; Vórtex Genie 2; Lavadora ultrassônica Unique, mod. USC 700, frequência ultrassônica de 40 kHz, potência ultrassônica de 45 watts; centrífuga Labnet Force 7 (máx. 7200 g).

Preparo da amostra por planejamento fatorial

No trabalho em questão foram utilizados quatro fatores, assim utilizou-se o método de planejamento fatorial multivariado 2^4 com ponto central ($n=3$). As variáveis foram: tempo de extração (5 ou 10 minutos.), líquido extrator (água deionizada ou etanol), tipo de extração (sonicação ou agitação por vórtex) e presença (ou ausência) de ácido clorídrico 1,14 M. A disposição do preparo das amostras está na Tabela 1:

Tabela 1 – Matriz de contrastes ilustrando o Planejamento Fatorial 2^4 utilizando as variáveis: Tempo de extração, Líquido Extrator, Tipo de Extração, Extrator para a extração de fenólicos em sementes de *M. pruriens*

Amostras	Tempo de extração	Líquido Extrator	Tipo de Extração	Extrator
	(-) = 5 min (+) = 10 min	(-) = Água (+) = Etanol	(-) = Vórtex (+) = Sonicação	(-) = Sem HCl (+) = Com HCl
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17-19	7,5 min	H ₂ O:Etanol(1:1)	3,75 min Vórtex + 3,75min Sonicador	HCl 0,57 M

Fonte: Próprio Autor.

O pó da semente (50 mg) foi misturado ao líquido extrator (1,5 ml) pelo tempo estabelecido. Em seguida, a mistura foi centrifugada (10 min., 7200 g) e o sobrenadante coletado em um balão volumétrico (10 ml). O processo foi repetido mais uma vez e o volume foi completado com água. A uma alíquota dessa mistura (0,4 ml) foi adicionado o reativo de Folin-Denis (1,25 ml), seguido da adição de solução saturada de Na₂CO₃ (2,5 ml) e o volume final completado com água em balão volumétrico de 25 ml. Após 30 min., a coloração obtida foi lida em espectrofotômetro a 720 nm e as concentrações calculadas com base na curva de calibração (FOLIN; DENIS, 1912).

Análise estatística dos Dados

Os dados de cada teste foram analisados estatisticamente, realizando-se teste o Q para a comparação entre médias e para os resultados dos PFs, os

dados foram inseridos em planilhas de quimiometria, com $\alpha=0,05$ (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

As análises entre as diferentes concentrações de fenólicos nas três diferentes variedades de *Mucuna pruriens* (após a técnica otimizada) foram realizadas por meio de software OriginPro 8, via teste de análise de variâncias – ANOVA – e comparação de médias utilizando os testes Tuckey e Bonferroni todos com $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

A curva analítica mostrou resultado linear, com um R² de 0,99835 e equação da reta igual a $y = 0,32123x + 0,05485$.

Em um planejamento fatorial o termo otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores (TEÓFILO; FERREIRA., 2006). O ponto central ensaiado em triplicata foi incluído no estudo para uma melhor avaliação de tendências e da reprodutibilidade da metodologia analítica envolvida (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). Deste modo, dos resultados obtidos pela extração otimizada das sementes de *Mucuna pruriens.*, observou-se que o melhor método de extração de fenólicos foi o realizado com tempo de agitação de 5 min. em vórtex, com água deionizada e presença de ácido clorídrico 1,14 M como líquido extrator (ensaio 9 – Figura 1).

Figura 1 – Planilha de quimiometria ilustrando o planejamento fatorial 2^4 com Ponto Central, para a extração de fenólicos em sementes de *M. Pruriens*

Planejamento Fatorial Completo 2^4 com Ponto Central													
Todas as Interações													
Identificação: Data: 8/10/2008													
Ensaio	Planejamento				Respostas		Estimadas		Efeitos		Erro		p
	textr	liq extr	tipo extr	HCl	y	ŷ	SG	Media	±	0,007243	0,0002		
1	-1	-1	-1	-1	0,71	0,7		1	-0,02508	±	0,015786	0,2533	
2	1	-1	-1	-1	0,73	0,8	SG	2	-0,38817	±	0,015786	0,0016	
3	-1	1	-1	-1	0,00	0,0		3	-0,00145	±	0,015786	0,9351	
4	1	1	-1	-1	0,00	0,0	SG	4	0,24982	±	0,015786	0,004	
5	-1	-1	1	-1	0,70	0,7		12	0,02124	±	0,015786	0,3107	
6	1	-1	1	-1	0,74	0,8		13	0,04851	±	0,015786	0,0916	
7	-1	1	1	-1	0,00	0,0		14	-0,03875	±	0,015786	0,1454	
8	1	1	1	-1	0,00	0,0		23	-0,00726	±	0,015786	0,8608	
9	-1	-1	-1	1	0,76	0,8	SG	24	0,3308	±	0,015786	0,0023	
10	1	-1	-1	1	0,51	0,5		34	-0,00244	±	0,015786	0,8911	
11	-1	1	-1	1	0,62	0,7		124	0,03293	±	0,015786	0,1723	
12	1	1	-1	1	0,86	0,6		134	0,04416	±	0,015786	0,1076	
13	-1	-1	1	1	0,63	0,7		234	-0,00626	±	0,015786	0,7288	
14	1	-1	1	1	0,65	0,7		1234	-0,01834	±	0,015786	0,3653	
15	-1	1	1	1	0,65	0,6		Nível de significância (α) 0,05					
16	1	1	1	1	0,69	0,6		CNPq					
17	0	0	0	0	0,6	0,5							
18	0	0	0	0	0,7	0,5							
19	0	0	0	0	0,7	0,5							

Fonte: Teófilo e Ferreira (2006)

Com as variáveis e os teores de fenólicos observados nas planilhas de quimiometria, comparados com os resul-

tado da melhor extração (ensaio 9), observou-se como efeito de primeira ordem que, ao usar etanol ao invés de água como líquido extrator, o rendimento de fenólicos foi reduzido em 51,21 % ($p=0,0016$) e na extração em presença de HCl ocorreu um aumento de 32,26 % ($p=0,004$) no rendimento. Além disso, a escolha pela presença de HCl é reforçada pelo fato de que sem o HCl ocorre uma maior solubilização de proteínas, que turvam o extrato, interferindo no processo.

Um efeito de interação de segunda ordem ocorreu entre o líquido extrator e a presença ou ausência de HCl. Neste caso, foi verificado que na extração realizada com etanol e HCl houve um aumento de 43,64 % ($p=0,0023$) dos compostos fenólicos. A existência de efeitos de segunda ordem tão significativos, como neste caso, implica em uma elevada inter-relação entre as variáveis, o que nos demonstra que tentativas univariadas poderiam levar à obtenção de resultados não verdadeiros (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Analisando-se o tipo de extração, na amostra que sofreu agitação por sonicação, a concentração de compostos fenólicos foi de 0,70 mg/mL, enquanto que a concentração encontrada na amostra agitada por vórtex foi de 0,76 mg/mL. Valores estatisticamente iguais ($p=0,9351$).

Em relação à variação do líquido extrator, na extração aquosa a concentração de fenólicos foi de 0,76 mg/mL, enquanto que na extração etanólica essa concentração foi de 0,62 mg/mL. Desse modo, se analisado o efeito do líquido extrator isoladamente observou-se um decréscimo na concentração de fenólicos totais em relação à presença de etanol. No entanto, quando ocorreu a interação entre etanol e HCl, esses apresentaram aumento em relação a concentração, mesmo assim, o melhor rendimento foi o observado quando utilizou-se água e HCl.

Não foi observada diferença significativa em relação ao tempo de extração ($p=0,2533$).

A partir do PF e dos resultados otimizados obtidos, foi realizada a quantificação de polifenóis totais nas variedades de *M. pruriens* (preta, cinza e verde). Para as variáveis que não apresentaram diferenças significativas entre si, optou-se pela que ofereceu maior praticidade para realização do ensaio: menor tempo de extração (5 min) e agitação em vórtex. Em todas as variedades analisadas as amostras encontraram-se dentro da razão Q. Assim, o Intervalo de Confiança (IC) foi definido com $t=99\%$. Os teores de polifenóis totais encontrados estão dispostos na Tabela 2.

O teor de fenólicos totais em *M. pruriens* variedade cinza foi $2,971 \pm 0,143$ mg de 3-HC %, na *M. pruriens* var. *preta* o teor foi de $2,916 \pm 0,093$ 3-HC % e um teor de $2,588 \pm 0,120$ 3-HC % foi encontrado na *M. pruriens* var. *verde*, todas em relação ao pó da semente (Tabela 2)

Tabela 2 – Quantificação de polifenóis totais em pó de três variedades de sementes de *M. pruriens* expressas em percentual 3-HC

Variedades de <i>M. pruriens</i>	IC (3-HC%)
CINZA	$2,971 \pm 0,143$
PRETA	$2,916 \pm 0,093$
VERDE	$2,588 \pm 0,120$

IC: Intervalo de Confiança com $t=0,99\%$.
3-HC: Ácido 3-hidroxicinâmico

Fonte: Próprio Autor.

Houve diferença significativa na análise de variância entre o conteúdo de fenólicos totais para as três variedades de sementes de *M. pruriens* $p=5,4910^{-4}$.

As análises estatísticas de médias dos conteúdos fenólicos apresentaram diferenças significativas entre as variedades preta e verdes ($p=5,0610^{-4}$ para o teste bonferroni e $p=4,6610^{-4}$ para Tuckey). Foi verificado ainda, diferenças significativas entre a variedades cinza e verde ($p=1,0710^{-4}$ para o teste bonferroni e $p=9,9710^{-5}$ para o teste Tuckey). Não houve diferença significativa entre as variedades cinza e preta.

DISCUSSÃO

Os resultados da curva de calibração estão de acordo com o previsto na legislação vigente (para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos em fitoterápicos), pois encontrou-se R^2 de 0,99835 e a preconizada pela legislação é de R^2 0,99 (BRASIL, 2003).

Em um estudo comparativo sobre a eficiência de métodos de extração dos polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*), observou-se que o método de extração sob sonicação por 15 minutos mostrou-se vantajoso na quantificação dos polifenóis quando comparado ao método de extração utilizando banho-maria à 80–90 °C por 30 minutos (LAGO; PAULA; BARRA, 2007)). Entretanto, os compostos fenólicos do chá verde compreendem substâncias tânicas do tipo condensadas, que são provavelmente diferentes em polaridade e características químicas das substâncias fenólicas contidas na semente de *M. pruriens*, portanto considerando a praticidade, economia e eficiência, o método de extração por vórtex foi o selecionado para análise.

A padronização de um método de extração ótima para fenólicos totais em sementes de *M. pruriens*, mostra-se de grande importância, uma vez que os fenólicos presentes nessa espécie podem estar intimamente relacionados com a principal propriedade medicinal desta planta, o tratamento de Mal de Parkinson (MP). Uma vez que, as substâncias fenólicas apresentam elevada atividade antioxidante e, como já descrito em literatura, o stress

oxidativo de pacientes com MP é alto (LONGHI et al., 2011). Portanto, essas substâncias poderiam ser uma das responsáveis pelo bons resultados obtidos nos tratamentos de MP com *M. pruriens*.

Estudos revelam que a quantidade de fenólicos totais de sementes de *M. pruriens*, coletadas na Índia, foi de 6,23% de fenólicos totais (trabalho sem relato do padrão de fenólicos) (SIDDHURAJU; VIJAYAKUMARI; JANARDHANAN, 1996). Outros autores, usando Folin-Ciocalteu para quantificação, encontraram concentrações entre 5,23 a 6,14% de fenólicos totais (trabalho sem relato do padrão de fenólicos) (SIDDHURAJU; BECKER; MAKKAR et al., 2000). Outras pesquisas de quantificação de fenólicos totais também utilizando o reativo de Folin-Denis, encontraram 7,75% desses compostos, expressos em trans-sipanic acid [sic] (ADEBOWALE; ADEYEMI; OSHODI, 2005). Analisando tais estudos pode-se observar grande variação no conteúdo de fenólicos totais entre sementes de *M. pruriens*. Porém, ressalva-se que os padrões de fenólicos nos estudos supra citados não foram iguais entre si, nem o mesmo utilizado no presente estudo, a comparação entre os diferentes trabalhos torna-se difícil. Além disso, os coeficientes de absorvidade molar das substâncias utilizadas com o reativo de Folin-Denis podem ser diferentes entre si, o que dificulta ainda mais as comparações entre diferentes estudos. Além disso, é válido ressaltar que as sementes utilizadas nos diferentes trabalhos não são as mesmas utilizadas no presente estudo: há variações de conteúdo químico, tanto na concentração de metabólitos especiais quanto na sua composição em diferentes substâncias químicas, sendo percebidas em mesmas espécies vegetais. Essas espécies são chamadas de quimiotipos – mesma espécie vegetal com conteúdo químico diferente. Isso pode ocorrer pela presença de caracteres genéticos flutuantes ou pelas variações do ambiente (EVANS, 1996).

Na literatura encontra-se a descrição de diversos métodos de preparo de amostras visando a determinação do teor de fenólicos totais: fervura com água (PRADO et al., 2005) ou água com sonicação em *Camellia sinensis* (L.) (LAGO; PAULA; BARRA, 2007); ou somente metanol para própolis (FUNARI; FERRO, 2006) e especificamente para *M. pruriens* têm-se uma solução de metanol:água 50:50 em banho a 95 °C por 10 min (BHAT; SHIDHAR; TOMITA-YOKOTANI, 2007), solução de acetona a 70 % em água (ADEBOWALE; ADEYEMI; OSHODI, 2005), entre diversos outros métodos. No entanto, pode-se verificar que não há relatos na literatura de outro trabalho que utilize o PF para preparo de amostras coma espécie vegetal *Mucuna pruriens*. Ressalta-se assim, a importância dos dados e da ferramenta de estudos mostrados no presente trabalho.

A otimização de metodologia de extração de um composto em específico é fundamental, visto que pequenas mudanças nos parâmetros de extrações testados podem acarretar em grandes diferenças, principalmente em termos de quantitativos deste componente.. Neste contexto, visando melhores extrações e diminuição do número de

experimentos, planejamentos fatoriais completos são promissores e vêm sendo largamente utilizados também para otimização de metodologia analítica.

CONCLUSÃO

O melhor método de extração de fenois totais foi realizado com agitação de 5 min. em vórtex, utilizando-se água deionizada em presença de ácido clorídrico 1,14M. As variáveis significativas com efeito de primeira ordem foram água como líquido extrator e presença de HCl 1,14 M, tendo um efeito de segunda ordem com a interação entre água (líquido extrator) e HCl.

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, A.; OSHODI, A. . Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. **Food chem.**, Barking, v. 89, n. 1, p. 37-48, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p.1-9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, Cambridge, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- BADIALE-FURLONG, E. et al. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, [S.l.], n. 13, p. 105-114, 2003.
- BELL, E. A.; NULU, J. R. L-Dopa and l-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4 – tetrahydroisoquinoline, a new imino acid, from seeds of *mucuna mutisiana*. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 10, p. 2191-2104, 1971.
- BHAT, R.; SRIDHAR, K. R.; TOMITA-YOKOTANI, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). **Food Chem.**, Barking, v. 103, n. 3, p. 860-866, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899. 2003.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p.519-535.
- CRUZADO, M.; et al. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). **Rev. Soc. Quím. Peru**, Peru, v. 79, n. 1, p. 57-63, 2013.
- DEMUNER, A. J. et al . Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 335-339, 2003.
- EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: W. B. Saunders, 1996, p. 59-68.
- FOLIN, O.; DENIS, W. Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 12, n. 2, p. 245-251, 1912.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência. tecnol. aliment.**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.
- GHOSAL, S.; SINGH, S.; BHATTACHARYA, S. K. Alkaloids of *Mucuna pruriens* chemistry and pharmacology. **Planta med.**, Stuttgart, v. 19, p. 279-284, 1971.
- HUSSAIN, G.; MANYAM, B. V. *Mucuna pruriens* Proves More Effective than L – DOPA in Parkinson ' s Disease Animal Model. **Phytother. Res.**, London, v. 11, n. 1, p. 419-423, 1997.

- LAGO, D. F.; PAULA, J. R. de; BARA, M. T. F. Estudo comparativo sobre a eficiência de métodos de extração dos polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*). **Rev. eletrônica farm.**, Goiania, v. 4, n. 2, p. 28-31, 2007.
- LONGHI, J. G. et al. In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. anti-oxidant activity. **Braz. j. pharm. sci.**, São Paulo, v. 47, p. 535-544, 2011.
- MOTTA, E. V. da S.; PINTO, N. de C. C.; SCIO, E. Phytochemical profile and antioxidant potential of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves. **Rev. eletrônica farm.**, Goiania, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.
- MOTTA, E. V. S. et al. . Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Rev. bras. plantas med**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.
- MISRA, L.; WAGNER, H. Alkaloidal constituents of *Mucuna pruriens* seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 18, p. 2565-2567, 2004.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. chromatogr.**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. de; NAGATA, N. Por que otimização multivariada ? **Eng. san. ambient.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- PRADO, C. C. A. et al. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (CHÁ VERDE). **Rev. eletrônica farm.**, Goiania, v. 2, n. 2, p. 164-167, 2005.
- RAJESHWAR, Y. et al. Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. **Eur. Bull Drug. Res.**, [S.], v. 13, n. 1, p. 31-39, 2005.
- SIDDHURAJU, P.; VIJAYAKUMARI, K.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC. **J. agric. food chem.**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2636-2641, 1996.
- SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; MAKAR, H. P. S. Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, *Mucuna pruriens* var. utilis. **J. agric. food chem.**, Washington, v. 48 n. 12, p. 6048-6060, 2000.
- SMIT, H. F. et al. Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 47, n. 2, p. 75-84, 1995.
- SOUZA, M. M. D. et al. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- TOZZI, A. M. G. A.; AGOSTINI, K.; SAZIMA, M. A new species of *Mucuna* Adans. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) from southeastern Brazil, with a key to Brazilian species. **Taxon**, [S.], v. 54, n. 2, p. 451-455, 2005.
- WICHERS, H. J. et al. Occurrence of L-DOPA and dopamine in plants and cell cultures of *Mucuna pruriens* and effects of 2, 4-D and NaCl on these compounds. **Plant Cell**, Rockville, v. 33, n. 0, p. 259-264, 1993.

Submetido em: 07/05/2015

Aceito em: 21/11/2016