

AVALIAÇÃO DE SOLVENTES PARA A EXTRAÇÃO DA CLOROFILA EM QUIABOS DESIDRATADOS (*Abelmoschus esculentus*)

RESUMO

O quiabo é um fruto de coloração verde predominante devido a clorofila, um composto de alta instabilidade pertencentes ao grupo das porfirinas, sendo facilmente destruída ou alterada, sendo assim um grande desafio para a indústria alimentícia é a conservação da coloração verde desse vegetal. A quantificação deste pigmento em hortaliças é relatado em literatura usando como solvente a acetona e o N,N-Dimetilformamida (DMF) utilizando tempos exaustivos de extração e alto rigor devido à instabilidade desse pigmento. O presente trabalho avalia a extração da clorofila em quiabos desidratados, nos dois solventes mencionados anteriormente em oito diferentes tempos para a obtenção de um método eficiente e com menos duração de extração. A extração ocorreu segundo o método de Inskip e Bloom (1985). Os resultados indicaram uma extração eficiente pelos dois diferentes solventes, tendo a acetona um melhor desempenho para os tipos a e b de clorofila. Quanto ao tempo, a estabilidade da extração foi a partir de 6 horas. Portanto, para uma extração eficiente, nessas condições, não há a necessidade de 24 h de extração e a utilização da acetona representa uma maior eficiência e economia.

INTRODUÇÃO

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*) é uma planta da família *malvaceae*, originária da África, sendo consumido amplamente nas distintas regiões do planeta, desde a sua folha até o seu fruto, devido a sua alta capacidade de produção ser significativa e seus diferentes benefícios fisiológicos. É considerado um alimento funcional por conter múltiplos nutrientes que fazem bem à saúde humana, tendo como benefícios a normalização do colesterol e açúcar no sangue (SARWAR, *et al.*, 2022; PANIGUEL *et al.*, 2022).

O prazo de validade do quiabo é curto, oriundo da degradação de seus compostos, inclusive a clorofila, sendo relatado o uso de diversos tratamentos para o aumento do seu tempo de conservação. As plantas verdes, como o quiabo, possuem essa pigmentação devido a clorofila do tipo “a” e “b”, o qual é um pigmento fotossintético que desempenha um papel crucial nas plantas, sendo um bom indicador para determinar o estado fisiológico da vegetação (BROWN, WILLIAMS e DASH, 2022). A clorofila é um composto de alta instabilidade, sendo facilmente destruída ou alterada, sendo assim um grande desafio para a indústria alimentícia é a conservação da coloração verde desses vegetais, minimizando a degradação da clorofila e tendo processos industriais de alta qualidade. A coloração do quiabo altera do verde brilhante para um verde-acastanhado durante o processamento e também armazenando, isso ocorre devido a degradação da clorofila em feofitinas, pela alteração do átomo de magnésio por um de hidrogênio (KING, LIU e LIU, 2001; NISHA, SINGHAL e PANDIT, 2004, YIN, HAN e LIU, 2007).

A quantificação desta porfirina em matriz vegetal é relatado em literatura usando como solvente extrator a acetona e o N,N-Dimetilformamida (DMF), tendo o tempo de extração entre 10 h e 24 h, utilizando diferentes técnicas como espectrofotometria, fluorescência e cromatografia líquida, necessitando de muita cautela durante o procedimento, uma vez que a clorofila é sensível a altas temperaturas, radiações, etc. (HOSIKIAN, *et al.*, 2010; INSKIP E BLOOM, 1985; SCHUMANN, *et al.*, 2005).

OBJETIVO

Geral: avaliar a extração da clorofila “a” e “b” em quiabos desidratados, utilizando a acetona e o DMF como solventes de extração em diferentes tempos.

Específicos: definir o melhor solvente para extração da clorofila do quiabo; obter o melhor tempo de extração para a clorofila do quiabo; determinar a razão soluto/solvente para a extração da clorofila do quiabo;

MATERIAIS E MÉTODOS

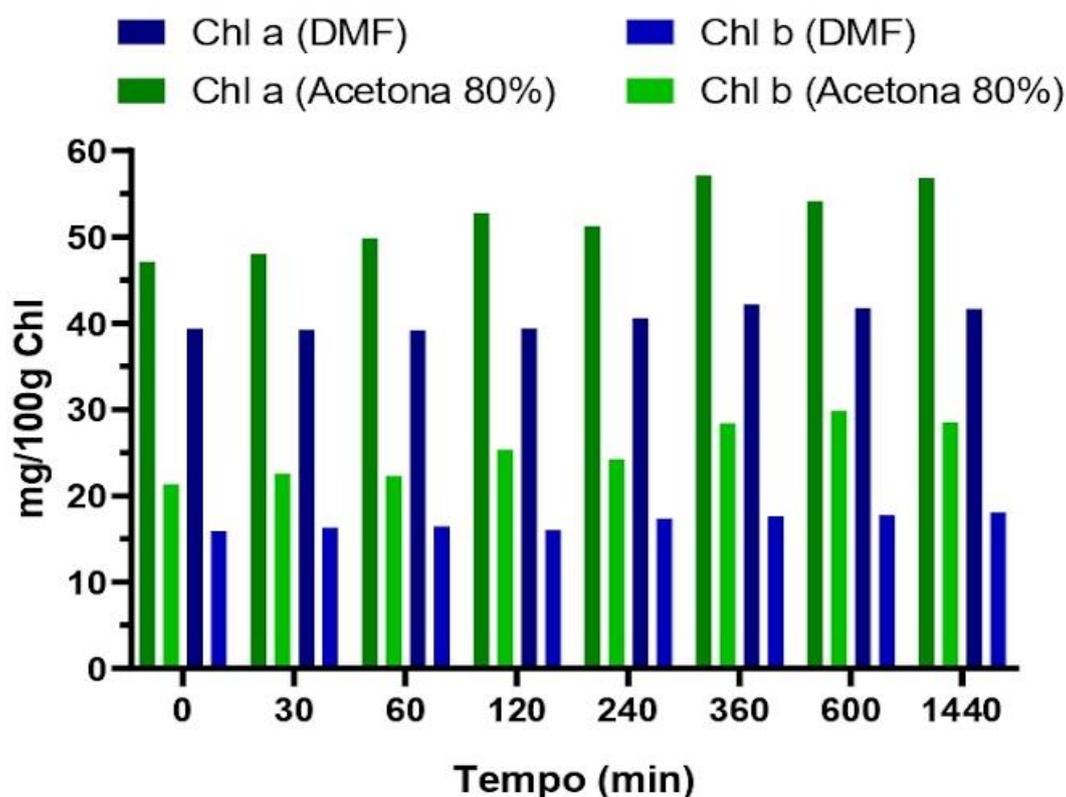
O quiabo desidratado foi obtido por da higienização com solução clorada a 100 ppm seguida de uma enxágue com solução clorada a 10 ppm, centrifugados por 1 minuto, cortados em espessuras de 2 cm de espessura, secados em secador a gás com circulação forçada de ar a 60°C até peso constante, triturada em moinho de facas e o tamanho de partícula homogeneizado em peneira de 40 mesh. A extração da clorofila a e b foi feita adaptando o método de Inskeep e Bloom (1985), onde foi pesado 1 g de amostra de quiabo seco em tubos de ensaio com rosca envelopados com papel alumínio e foram adicionados 4 mL do solvente, N,N-Dimetilformamida (DMF) para um ensaio e acetona (80%) para outro ensaio, mantendo a proporção utilizada no trabalho original de 1:4. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos e permaneceram em repouso na ausência de luz por diferentes tempos (0, 30, 60, 120, 240, 360, 600 e 1440 minutos). Após cada tempo de extração, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado, e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 647 e 665 nm. O cálculo foi realizado seguindo a equação fornecida no trabalho original, ajustando o fator de diluição utilizado na leitura e convertendo para miligramas de clorofila (“a” ou “b”) por 100 g de amostra (mg/100g Chl). Para verificar a saturação do meio, escolheu-se um ponto aleatório do melhor solvente e fez a repetição utilizando a proporção de 1:8, representando 0,5 g de amostra para 4 mL do melhor solvente.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média seguida do desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparações entre as médias foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do software Minitab 18®.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A figura a seguir ilustra a variação de extração de clorofila a e b nos quiabos ao longo do tempo estudado.

Figura 1 - Dados obtidos para a extração da clorofila utilizando os diferentes solventes.



A extração utilizando acetona 80 % demonstrou ser mais eficiente para a obtenção do maior teor de ambos os tipos de clorofila desde o tempo inicial, apresentando diferença estatística entre os solventes. O DMF teve um desempenho inferior em todos os tempos, mesmo após 24 horas de extração, o teor de clorofila não foi superior ao tempo 0 da acetona. Observa-se também a estabilidade da clorofila em ambos os solventes, não tendo a degradação dela no extrato, mesmo sem a adição de algum estabilizante. A parte majoritária das plantas de coloração verde possuem os dois tipos de clorofila, sendo esses compostos extremamente similares, diferenciando somente no carbono 3. A clorofila-a possui um grupo metil, enquanto a clorofila-b tem um grupo formil, o que lhe garante mais estabilidade em tratamentos térmicos. Ao contrário de outros trabalhos com quiabos, os resultados indicaram um maior teor de clorofila-a em relação a clorofila-b, o que pode estar relacionado às condições de plantio das amostras analisadas (MOUNIR *et al.*, 2020; SARWAR, *et al.*, 2022).

Tabela 1. Resultados da extração da clorofila total do quiabo desidratado em diferentes tempos.

Tempo (min)	Acetona 80% (mg/100g Chl)	N,N-Dimetilformamida (mg/100g Chl)
0	68,45 ± 0,77 ^{e,*}	55,38 ± 0,09 ^c
30	71,10 ± 0,94 ^{d,*}	55,52 ± 0,26 ^c
60	72,60 ± 1,29 ^{d,*}	55,52 ± 0,43 ^c
120	78,11 ± 0,55 ^{b,*}	55,89 ± 1,06 ^c
240	75,71 ± 0,54 ^{c,*}	57,93 ± 0,48 ^b
360	85,52 ± 0,17 ^{a,*}	59,75 ± 0,41 ^a
600	83,81 ± 0,60 ^{a,*}	59,56 ± 0,48 ^a
1440	84,85 ± 0,59 ^{a,*}	59,83 ± 0,05 ^a

*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste tukey entre linhas (tempo) e asterisco indica diferença pelo teste student estatística entre colunas (solvente), ambos os testes com nível de confiança de 95 %.

O teor total de clorofila foi maior utilizando acetona 80%, obtendo uma estabilidade na extração a partir de 6 horas, com uma grande variação nos tempos inferiores, tendo um aumento superior a 15 mg/100g de clorofila. Os resultados da extração utilizando o DMF apresentaram um comportamento similar ao da acetona, obtendo estabilidade a partir de 6 horas, com uma variação menor e com uma diferença inferior a 5 mg/100g de clorofila entre os tempos 0 e 360 min. Em todos os tempos estudados, o teor total de clorofila foi superior na extração com acetona 80%, indicando que em condições de extração a temperatura ambiente e razão 1 (soluto):4 (solvente) é o melhor solvente para extração da clorofila, tanto do tipo a quanto b, na matriz vegetal do quiabo.

Quanto à saturação do meio, na proporção de 1:8 extraído por 4 horas, obteve-se o valor de 79,03 ± 0,65 mg/100g Chl, tendo diferença estatística quando comparado com a mesma condição em uma razão maior. O que indica uma leve saturação do meio, tornando mais viável a utilização dessa proporção pela economia de amostra, adição de etapas e completa extração do composto.

Quando os resultados são comparados a outros trabalhos envolvendo extração da clorofila em quiabos, os valores obtidos foram superiores ao relatado por Mounir *et al.*, (2020) que também utilizou o mesmo solvente e 16 horas de extração; e inferiores ao trabalho de Jasmine e Merina (2012) que efetuou a análise em folhas de quiabo e não no fruto. Apesar de valores superiores, a clorofila quando submetida a processamentos pode sofrer degradação por diversos fatores, como: tratamentos térmicos durante a secagem, causando a conversão desses compostos em seus respectivos produtos de degradação; durante o procedimento de quebra das paredes celulares, liberando ácidos orgânicos que podem promover a degradação da clorofila ao substituir o cátion magnésio por um átomo de hidrogênio, formando feofitina; e por degradação enzimática da clorofila pela

clorofilase, após a desnaturação das proteínas removendo a proteção da clorofila (YIN, HAN e LIU, 2007; INDRASTI *et al.*, 2018)

CONCLUSÃO (EM MAIÚSCULA E NEGRITO)

A extração da clorofila “a” e “b” em quiabos desidratados foi melhor utilizando como solvente extrator a acetona 80 % do que o DMF. Em relação ao tempo de extração, a partir de 6 h não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais tempos (10 h e 24 h). Entretanto, houve diferença na razão soluto:solvente, prevalecendo a proporção de 1:8, respectivamente. Portanto, tem-se uma extração eficiente pelo método relatado com 360 minutos de extração em acetona 80 % com razão 1:8 de soluto e solvente a temperatura ambiente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BROWN, Luke A.; WILLIAMS, Owen; DASH, Jadunandan. Calibration and characterisation of four chlorophyll meters and transmittance spectroscopy for non-destructive estimation of forest leaf chlorophyll concentration. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 323, p. 109059, 2022.
2. HOSIKIAN, Aris et al. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. **International journal of chemical engineering**, v. 2010, 2010.
3. INDRASTI, D. *et al.* Stability of chlorophyll as natural colorant: a review for Suji (*Dracaena Angustifolia* Roxb.) leaves' case. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 6, n. 3, p. 609-625, 2018.
4. INSKEEP, W. P.; BLOOM, P. R.. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. **Plant physiology**, v. 77, n. 2, p. 483-485, 1985.
5. JASMINE, M., S.; MERINA, J. A. Effects of gibberellic acid on seedling growth, chlorophyll content and carbohydrate metabolism in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) genotypes under saline stress. **Research Journal of Chemical Sciences**. 2012.
6. KING, V. An-Erl; LIU, Chia-Fang; LIU, Yi-Jing. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration. **Food research international**, v. 34, n. 2-3, p. 167-175, 2001.
7. MOUNIR, Sabah et al. Phytochemicals, chlorophyll pigments, antioxidant activity, relative expansion ratio, and microstructure of dried okra pods: Swell-drying by instant controlled pressure drop versus conventional shade drying. **Drying Technology**, v. 39, n. 15, p. 2145-2159, 2021.
8. NISHA, P.; SINGHAL, R. S.; PANDIT, A. B. A study on the degradation kinetics of visual green colour in spinach (*Spinacea oleracea* L.) and the effect of salt therein. **Journal of food engineering**, v. 64, n. 1, p. 135-142, 2004.
9. SARWAR, Samreen et al. Spatial variations in the biochemical potential of okra [*Abelmoschus esculentus* L.(Moench)] leaf and fruit under field conditions. **Plos one**, v. 17, n. 2, p. e0259520, 2022.
10. SCHUMANN, Rhena et al. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 3, p. 213-222, 2005.
11. YIN, Yongguang; HAN, Yong; LIU, Jingbo. A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 4, p. 1256-1260, 2007.