



## **EFEITO DE ENZIMAS NA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA *Equisetum hyemale* (CAVALINHA)**

Giovana Beatriz Borges Ferreira <sup>1,6</sup>  
Douglas César Marques <sup>2,6</sup>  
Fabrício Gomes Menezes Porto <sup>3,6</sup>  
Welisson Martins Rocha <sup>4,6</sup>  
Vitória Aparecida Luiz <sup>5,6</sup>

Implementação de práticas agrícolas sustentáveis

### ***Resumo***

Enzimas como Flavourzyme, Alcalase e Savinase são utilizadas para melhorar a extração de compostos bioativos do extrato de cavalinha, alterando sua composição química. A Flavourzyme, composta por proteases e peptidases, aumenta a liberação de peptídeos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Diante disto este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das enzimas Flavourzyme, Alcalase e Savinase aplicadas no extrato da cavalinha. O processo de hidrólise enzimática foi conduzido com a proporção de 80 g/L de cavalinha em meio aquoso, como exemplo, 0,5% de Flavourzyme é equivalente a:  $0,5\% * 8 \text{ g (em 100g de extrato)} = 0,033\text{g de Flavourzyme em 100g de extrato}$ , sendo em cada corrida calculado a quantidade de proteína, a depender do volume de extrato. Após o tratamento, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro. Os resultados mostraram que Savinase e Alcalase não tiveram efeito significativo sobre o teor de polifenóis. Em contraste, a Flavourzyme teve um impacto substancial na produção de polifenóis, especialmente nas concentrações de 0,4 a 0,5. Embora a combinação de Savinase e Alcalase tenha aumentado a produção de polifenóis em concentrações mais altas, a Flavourzyme se destacou como a enzima mais eficaz.

**Palavras-chave:** Hidrólise enzimática; Extratos vegetais; polifenóis

---

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Mestrado Profissional em Produção Vegetal, Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba, Departamento de Agronomia, giovana.ferreira@satis.ind.br.

<sup>2</sup> Aluno do Curso de Mestrado Profissional em Produção Vegetal, Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba, Departamento de Agronomia, douglas.cesar@satis.ind.br.

<sup>3</sup> Dr. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Monica, Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, fabricio@satis.ind.br.

<sup>4</sup> Mr. Universidade de Uberaba – Campus Aeroporto, Departamento de Pós-Graduação Profissional em Engenharia Química, welisson.rocha@satis.ind.br.

<sup>5</sup> Ba. Centro Universitário do Planalto de Araxá – Campus Araxá, Departamento de Agronomia, victoria.lui@satis.ind.br.

<sup>6</sup> Satis Indústria e Comércio LTDA.



## INTRODUÇÃO

O crescimento da agricultura e a crescente demanda por alimentos resultaram no uso excessivo de produtos sintéticos, impactando negativamente o meio ambiente e a saúde dos consumidores. Em resposta, aumentou o interesse por estratégias ecológicas, como a pesquisa de extratos vegetais, que atuam como indutores de resistência e bioestimulantes, apresentando propriedades herbicidas, inseticidas e fungicidas (CARVALHO et al., 2022).

Este estudo utiliza a Cavalinha, planta medicinal da família Equisetaceae, conhecida por sua rica composição nutricional e concentração de silício, que confere benefícios como resistência imunológica e maior eficiência em condições de déficit hídrico (PEREIRA et al., 2019; ROCHA et al., 2024; GYSI et al., 2021).

## METODOLOGIA

A obtenção do extrato de cavalinha envolveu várias etapas cruciais, começando pela seleção de plantas mais desenvolvidas e com coloração verde-amarelada. Após a higienização, as plantas foram pré-secadas a 50°C por 1 hora, facilitando a moagem em um moinho de facas para reduzir o tamanho das partículas e otimizar a extração. Amostras de cavalinha foram então separadas para caracterização inicial, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

### Composição da cavalinha

**Tabela 1** – Composição da Cavalinha

Análises	Proteína Bruta (%)	Silício (%)	Fibra em Detergente Ácido (%)	Celulose (%)
<b>Resultados</b>	6,86	2,44	46,96	36,00

**Fonte:** Autor, 2024.

Após a moagem da planta, o processo de extração enzimática foi iniciado, sendo essa uma metodologia nova na aplicação para cavalinha. Um delineamento experimental foi preparado com o objetivo de obter os melhores resultados possíveis na extração, visando à obtenção de Polifenóis e Silício. A tabela 2 demonstra o delineamento experimental para produção dos extratos.



### Preparação do extrato vegetal por hidrólise enzimática

O processo de hidrólise enzimática foi realizado com um fatorial  $3^3$  (0; 0,25; 0,50), conforme a Tabela 2, utilizando enzimas em relação à concentração de cavalinha (80 g/L ou 8%). Por exemplo, 0,5% de Flavourzyme corresponde a 0,033 g em 100 g de extrato. A quantidade de proteína foi calculada em cada corrida, dependendo do volume de extrato utilizado.

**Tabela 2** – Delineamento experimental fatorial  $3^3$ .

Corrida	(%) Flavourzyme	(%) Alcalase	(%) Savinase
1	0,000000	0,000000	0,000000
2	0,000000	0,000000	0,250000
3	0,000000	0,000000	0,500000
4	0,000000	0,250000	0,000000
5	0,000000	0,250000	0,250000
6	0,000000	0,250000	0,500000
7	0,000000	0,500000	0,000000
8	0,000000	0,500000	0,250000
9	0,000000	0,500000	0,500000
10	0,250000	0,000000	0,000000
11	0,250000	0,000000	0,250000
12	0,250000	0,000000	0,500000
13	0,250000	0,250000	0,000000
14	0,250000	0,250000	0,250000
15	0,250000	0,250000	0,500000
16	0,250000	0,500000	0,000000
17	0,250000	0,500000	0,250000
18	0,250000	0,500000	0,500000
19	0,500000	0,000000	0,000000
20	0,500000	0,000000	0,250000
21	0,500000	0,000000	0,500000
22	0,500000	0,250000	0,000000
23	0,500000	0,250000	0,250000
24	0,500000	0,250000	0,500000
25	0,500000	0,500000	0,000000
26	0,500000	0,500000	0,250000
27	0,500000	0,500000	0,500000

**Fonte:** Autor, 2024.



### **Análises dos extratos produzidos**

Para confirmação dos resultados obtidos com os extratos, foi quantificado teor de Polifenóis pelo método de FolinCiocalteu e de Silício utilizando absorção atômica. Segue abaixo as metodologias realizadas para as análises.

### **Determinação de Polifenóis**

#### **Preparo dos reagentes para análise do método FolinCiocalteu**

A solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) foi preparada usando 20,0 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  com 80 mL de água quente ( $> 80^\circ\text{C}$ ) para dissolução, esperou-se o equilíbrio térmico com o ambiente e então o volume foi corrigido em balão volumétrico de 100 mL (SINGLETON V. L., et al, 1999).

O preparo da solução FolinCiocalteu foi feita utilizando 50 mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich 97,5 – 102,5% de pureza), adicionados a um balão volumétrico de 10 ml e completado com álcool etílico 99,5%. Após o preparo foi homogeneizada, revestida com papel alumínio e armazenada em refrigerador. (LAZZAROTTO, 2020).

#### **Preparo das amostras para determinação do teor de polifenóis totais**

Para a análise, foram preparadas amostras com 3,95 mL de água destilada e 0,05 mL de extrato de cavalinha, à qual se adicionou 0,75 mL de solução de carbonato de sódio e 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Após 30 minutos em ambiente escuro, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro (SINGLETON et al., 1999). Para a solução branca, foram utilizados 4 mL de água destilada, 0,75 mL de carbonato de sódio e 0,25 mL de reagente Folin-Ciocalteu, também incubados em escuro por 30 minutos. O equipamento foi zerado com a solução branca antes da leitura das amostras a 765 nm (LAZZAROTTO, 2020).

### **Determinação de Silício**

A análise de silício foi realizada seguindo os procedimentos de HALLMARK (1982), com adaptações. A amostra foi diluída em 5 mL em um balão de 50 mL e completada com água destilada. Utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Agilent 55 AA com lâmpada de quantificação de silício e chama redutora com alta concentração de acetileno. Após a calibração, foi feita a curva de calibração para quantificar o teor de silício em PPM.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Resultados da análise de Polifenóis

A tabela 3 estão representadas as concentrações de Polifenóis que foram obtidas no preparo dos extratos, após o uso de espectrofotômetro para leitura das amostras.

**Tabela 3** – Concentração de polifenóis

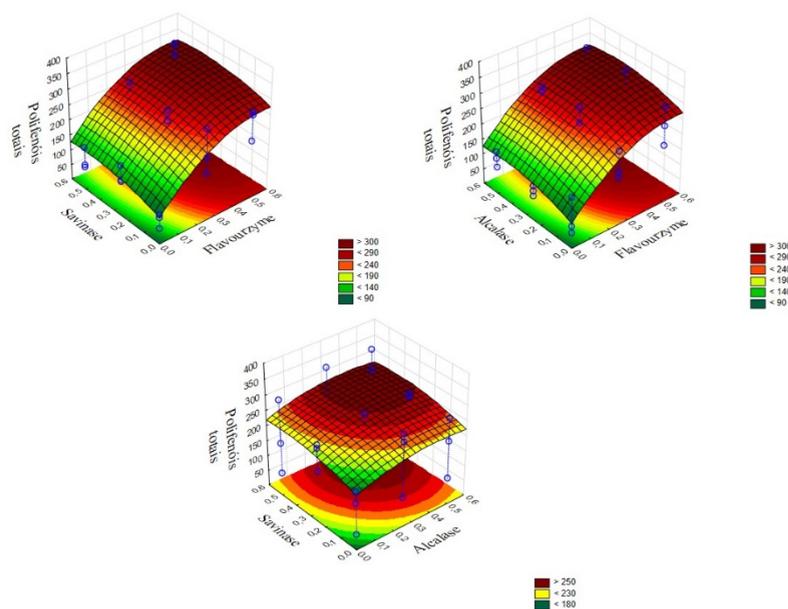
Corrida	Concentração polifenóis (ppm)
1	51,0
2	167,0
3	74,2
4	96,8
5	114,8
6	81,3
7	87,8
8	119,3
9	140,6
10	154,8
11	242,4
12	173,4
13	300,3
14	212,1
15	249,4
16	208,2
17	274,6
18	287,5
19	190,2
20	253,3
21	315,8
22	275,9
23	284,9
24	354,4
25	284,2
26	284,9
27	353,8

**Fonte:** Autor, 2024.



## EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com os de HABERMANN et al. (2015), que quantificaram polifenóis entre 37,32 e 440,40 PPM, validando a metodologia utilizada. CAVALLARO (2019) encontrou concentrações de polifenóis nos hidrolisados de feijão superiores às da cavalinha, evidenciando uma extração mais eficaz. OLIVEIRA (2009) obteve 73,28 mg/g de matéria seca do fruto do muricizeiro, um valor significativamente superior ao maior resultado do presente estudo (354,4 mg/L ou 4,43 mg/g), indicando que o muricizeiro é uma matéria-prima mais eficaz que a cavalinha para a extração de compostos fenólicos. A figura 1 apresenta os resultados das análises das enzimas Flavourzyme, Alcalase e Savinase nas condições deste experimento.



**Figura 01** – Superfície de resposta do efeito das enzimas na extração de polifenóis.

Nos dois gráficos superiores, observa-se que tanto a enzima Savinase quanto a Alcalase, quando usadas isoladamente, não causam impacto significativo no teor de polifenóis (eixo z). A região verde, que vai de 0 a 0,6, mostra que não há alteração nessa faixa, independentemente da concentração dessas enzimas. No trabalho realizado por HEEMANN. A. C. et al., 2019, sobre extração de polifenóis de erva mate verde assistida por enzimas, teve como resultado o aumento da extração de compostos



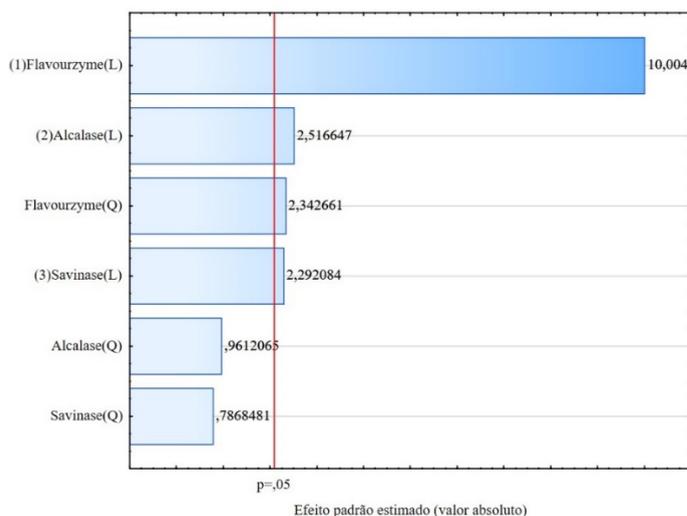
## EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

polifenólicos. BORA (2005), ao avaliar a concentração de polifenóis e o potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, concluíram que, a concentração de polifenóis nas amostras está diretamente ligada à atividade antioxidante. A amostra com maior teor de compostos fenólicos apresentou a atividade antioxidante mais elevada, enquanto amostras com menor quantidade de polifenóis tiveram uma atividade menos intensa.

No entanto, com a adição da Flavourzyme, começa a ocorrer uma mudança. Próximo às concentrações de 0,4 e 0,5, a Alcalase apresenta uma leve influência (área mais vermelha no topo do gráfico), mas o efeito mais pronunciado é atribuído à Flavourzyme.

No gráfico inferior, que exclui a Flavourzyme e mostra a combinação de Savinase com Alcalase, percebe-se regiões mais bem definidas. Em baixas concentrações dessas duas enzimas, o teor de polifenóis também é baixo. Contudo, à medida que as concentrações de Alcalase e Savinase aumentam para cerca de 0,4 e 0,5, há um crescimento na produção, atingindo um pico acima de 250. Ainda assim, é evidente que a Flavourzyme continua sendo a enzima com o maior impacto no teor de polifenóis.

Na Figura 02, o gráfico de Pareto mostra que a Flavourzyme tem um efeito significativo, com valor de 10, estatisticamente diferente. A linha vermelha destaca que a Flavourzyme linear, a Alcalase linear, a Flavourzyme quadrática e a Savinase linear possuem efeitos significativos e são estatisticamente relevantes.



**Figura 02** – Pareto dos efeitos apresentados por cada enzima



### Resultados da análise de Silício

Na tabela 4 estão representadas as concentrações de silício que foram obtidas no preparo das análises, após o uso da absorção atômica para leitura das amostras.

**Tabela 4** – Concentração de Silício

Corrida	Concentração Si (ppm)
1	73
2	68
3	72
4	72
5	64
6	83
7	65
8	70
9	76
10	77
11	80
12	65
13	74
14	76
15	73
16	59
17	80
18	75
19	71
20	96
21	90
22	76
23	82
24	89
25	83
26	92
27	82

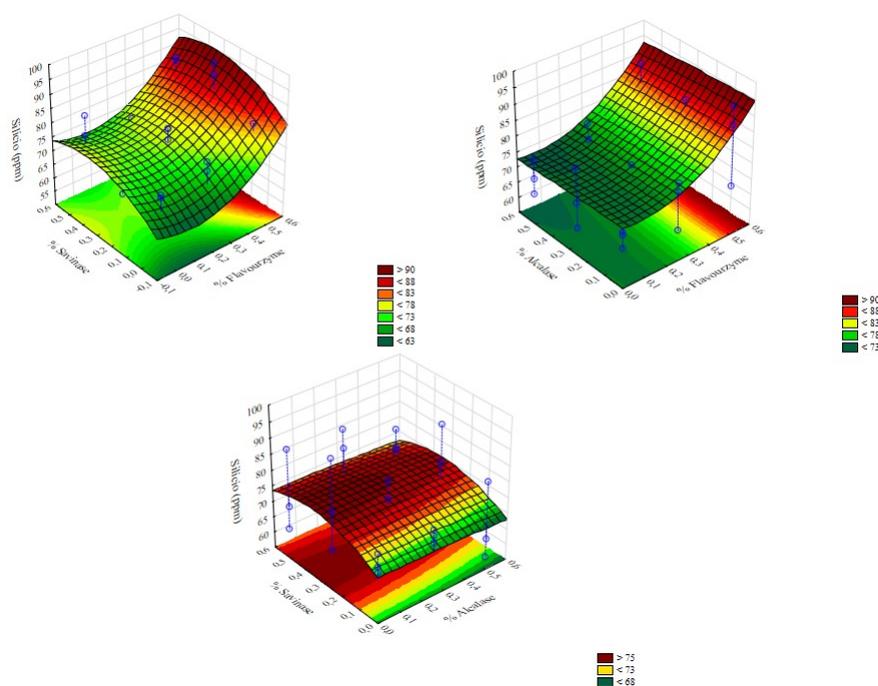
**Fonte:** Autor, 2024.

A Figura 3 apresenta os resultados da análise das enzimas Flavourzyme, Alcalase e Savinase. O primeiro gráfico mostra que a Savinase não teve efeito significativo isoladamente, mas quando



## EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

combinada com Flavourzyme a 0,6%, houve um aumento de silício (Si), alcançando aproximadamente 93 PPM com Savinase a 0,3%. O segundo gráfico indica que o aumento das concentrações de Alcalase e Flavourzyme resulta em uma elevação significativa do silício, próximo a 95 PPM, sugerindo que a sinergia entre essas enzimas otimiza a liberação de silício. A combinação de Savinase e Alcalase, por sua vez, apresentou os melhores resultados com Savinase isoladamente, que atingiu cerca de 75 PPM, mas sua associação com Alcalase reduziu a concentração de silício em aproximadamente 26,67%, indicando uma possível interferência da Alcalase na eficiência da Savinase.



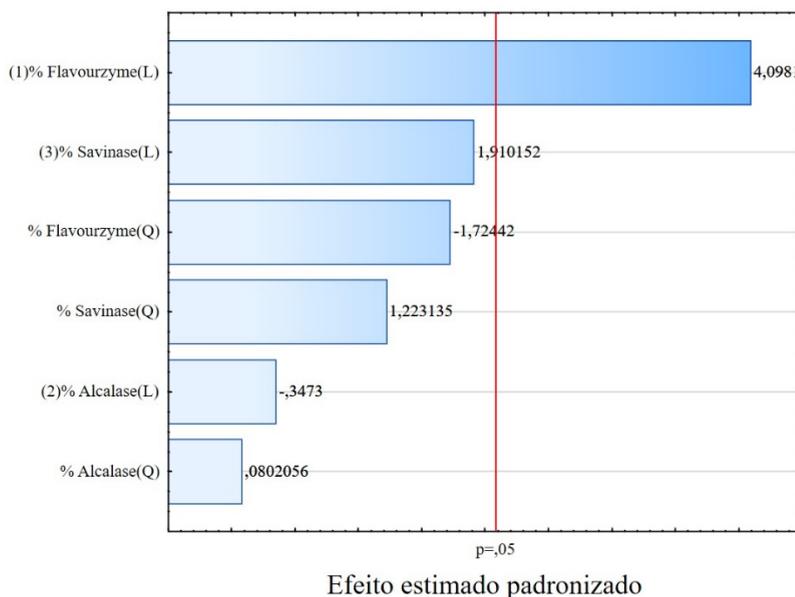
**Figura 03** – Superfície de resposta do efeito das enzimas na extração de silício.

Por fim, ao comparar os resultados obtidos com os de Rocha (2024), observamos que nossos resultados foram inferiores. O melhor resultado deste trabalho apresentou uma diferença de 0,095% de Silício na hidrólise enzimática, em contraste com 0,4% na hidrólise alcalina do estudo de Rocha. É possível que a extração alcalina extraia compostos que aumentem a concentração de Silício. No entanto, os estudos com enzimas têm um grande potencial para elevar essa concentração (ROCHA *et al.*, 2024).

No gráfico de Pareto (Figura 4), a enzima Flavourzyme destacou-se como a mais eficaz, com um valor de 4,0981, diferindo estatisticamente das demais enzimas analisadas. Esse resultado indica



que a Flavourzyme teve um impacto significativo em comparação com as outras, que, por sua vez, não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. Isso sugere que, dentro das condições experimentais avaliadas, a Flavourzyme desempenhou um papel dominante na resposta observada, sendo uma opção promissora para aplicações que visam maximizar a eficiência do processo.



**Figura 04** – Pareto dos efeitos apresentados por cada enzima

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições deste experimento, os resultados indicaram que Savinase e Alcalase não tiveram um efeito significativo sobre o teor de Polifenóis e Silício. Em contraste, a Flavourzyme demonstrou um impacto substancial na produção de Polifenóis, especialmente nas concentrações de 0,4% a 0,5%. Embora a combinação de Savinase e Alcalase tenha promovido um aumento na produção de Polifenóis em concentrações mais elevadas, a associação de cada uma delas, separadamente, com a Flavourzyme resultou em um aumento significativo na concentração de silício, sendo a combinação de Alcalase e Flavourzyme a mais eficaz. Para estudos futuros, é recomendada a investigação de diferentes concentrações de Alcalase em combinação com a Flavourzyme. Em resumo, a Flavourzyme destacou-se como a enzima mais eficiente para a otimização da produção de polifenóis e silício.



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a SATIS (Satis Indústria e Comércio LTDA) e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio durante as etapas de pesquisa e desenvolvimento deste trabalho, proporcionando recursos e ambiente propício para sua realização.

## REFERÊNCIAS

- BORA, K., Miguel, O. G., Andrade, C. A., & Oliveira, A. O. T. D. (2005). **Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, DICKSONIACEAE.** *Visão Acadêmica*, 6(2), 6-15.
- CARVALHO, Ricardo da Silva et al. **Plant extracts in agriculture and their applications in the treatment of seeds.** *Ciência Rural*, v. 52, n. 5, p. e20210245, 2021.
- CASSEL, Júlia Letícia et al. **Benefits of the application of silicon in plants.** Seven Editora, 2023.
- CAVALLARO, Gabriela. **Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) para obtenção de peptídeos bioativos.** 2019. Tese de Doutorado. [sn].
- HABERMANN, et al (2016). “**Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg**” <https://doi.org/10.1590/1519-6984.03815>
- HEEMANN, Ana Carolina Winkler et al. **Extração de polifenóis de erva-mate verde assistida por enzimas.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 22, p. e2017222, 2019.
- LAZZAROTTO, SR da S. et al (2020). **Método de Folin Ciocalteau adaptado para quantificar polifenóis em extratos de erva-mate.** 2020.
- OLIVEIRA, Johnatt Allan Rocha. **Extração de polifenóis das folhas do murucizeiro (*byrsonima crassifolia*) por via enzimática.** Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Pará. 2009. 105f.
- ROCHA, Welisson Martins *et al.* **Fungicidal effect of *Equisetum hyemale* extract obtained by alkaline hydrolysis.** 2024. Congresso Brasileiro de Biotecnologia Industrial. Disponível em: <https://cobbind.com.br/upload/trabalhos/t1arquivo/UzQcVIEGZV2Js7EtrpVSwp8fgMI4.pdf>. Acesso em: 16 set. 2024.



21º Congresso Nacional de  
**MEIO AMBIENTE**

de Poços de Caldas  
22 a 25 DE OUTUBRO | 2024

**EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS**

ROCHA, Welisson Martins *et al.* **Fungicidal effect of Equisetum hyemale extract obtained through solid-liquid extraction.** 2024. Congresso Brasileiro de Biotecnologia Industrial. Disponível em: <https://cobbind.com.br/evento/cobbind2024/trabalhosaprovados/naintegra/17111>. Acesso em: 16 set. 2024.

SINGLETON VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. (1999). “**Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.**” *Methods in Enzymology*.