



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**NATAN RODRIGUES SANTANA DA HORA**

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DO ESTIGMA  
DE *Zea mays* L.**

**SALVADOR  
2020**

**NATAN RODRIGUES SANTANA DA HORA**

**AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DO ESTIGMA  
DE *Zea mays* L.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

**SALVADOR  
2020**

DA HORA, Natan Rodrigues. Avaliação metabolômica e atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de extratos do estigma de *Zea mays* L. 142 f. il. Dissertação (Mestrado em bioquímica e biologia molecular) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O estigma de milho é parte da flor feminina de *Zea mays* L., bem conhecida pela medicina tradicional chinesa. A literatura científica relata suas atividades farmacológicas, mas são poucos os estudos científicos que realizam um mapeamento químico global e correlacionam os metabólitos com as atividades investigadas por meio de uma metabolômica.

**OBJETIVO:** Caracterizar o perfil metabolômico e as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de extratos do estigma de *Zea mays* L. *in natura* e seu produto comercial.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Os extratos foram obtidos a partir do estigma do milho, por maceração em diferentes solventes, como hexano, acetato de etila e etanol. A atividade antioxidante foi fornecida pelo método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e os fenóis totais foram quantificados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos não filamentosos. A citotoxicidade foi avaliada contra uma linhagem tumoral de glioma de camundongo (C6), através da análise da viabilidade celular pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O perfil metabolômico foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Na análise univariada foram utilizadas análises de variância (ANOVA), plotagem de vulcão e análise de correlação. Na análise multivariada os métodos foram o PLS-DA, VIP e o mapa de calor. Em geral, os extratos etanólicos apresentam melhor atividade antioxidante e maiores valores de fenóis totais. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) variou de 77,44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato etanólico do estágio reprodutivo 1 (E1R1) até 950,31  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato hexânico do produto comercial (CH). Os valores de fenóis totais variaram de 12,95 mg EAG g<sup>-1</sup> para extrato etanólico com etanol de produto comercial a 46,14 mg EAG g<sup>-1</sup> para extrato etanólico no estágio reprodutivo 1. O extrato com acetato de etila estágio reprodutivo 1 (EAR1) apresentou melhor atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O extrato EAR1 apresentou maior atividade citotóxica, pois conseguiu diminuir a viabilidade da linhagem tumoral C6 (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 40,74%. Foram identificados trinta

metabólitos. **CONCLUSÃO:** Embora alguns estudos apresentem as atividades biológicas dos extratos de *Zea mays* L., este foi o pioneiro em apresentar uma avaliação metabolômica global de extratos com diferentes polaridades e correlacionar os resultados das atividades antioxidante, citotóxica e antitumorigênica com os metabólitos localizados nos extratos. A ramnose, yiamolose B, ácido 2-ceto-L-glucônico, glicose, ácido láctico, ácido glicérico são os metabólitos mais correlacionados com as atividades biológicas. A utilização dos solventes, acetato de etila e etanol, influenciou o perfil metabolômico dos extratos, EAR1, E1R1 e E2R3, e estes apresentaram atividades biológicas superiores quando comparados com os extratos hexânicos. Os extratos no estágio fenológico reprodutivo 1 apresentaram perfil metabolômico importante para as atividades biológicas testadas neste estudo quando comparado estágio fenológico reprodutivo 2. Os extratos obtidos das amostras *in natura* apresentaram maiores atividades biológicas quando comparados com as amostras comerciais.

Palavras-chave: Seda de milho, Metabolômica, Glioma murino C6.

DA HORA, Natan Rodrigues. Metabolomic evaluation and antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of extracts of the stigma of *Zea mays* L. 142 f. il. Dissertation (Master in Biochemistry and Molecular Biology) - Federal University of Bahia, Salvador, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Corn silk is part of the female flower of *Zea mays* L., well known in traditional Chinese medicine. The scientific literature reports its pharmacological activities, but there are few scientific studies that perform a global chemical mapping and correlate the metabolites with the activities investigated through a metabolomics. **OBJECTIVE:** To characterize the metabolomic profile and the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of extracts of the stigma of *Zea mays* L. in natura and its commercial product. **MATERIALS AND METHODS:** The extracts were chosen from the corn silk, by maceration in different solvents, such as hexane, ethyl acetate and ethanol. The antioxidant activity was requested by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) free radical scavenging method and the total phenols were quantified by the Folin-Ciocalteu assay. Antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method against Gram-positive and Gram-negative bacteria, in addition to non-filamentous fungi. Cytotoxicity was evaluated against a mouse glioma tumor line (C6), through analysis of cell viability by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The metabolomic profile was evaluated by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In the univariate analysis, analysis of variance (ANOVA), volcano plotting and correlation analysis were used. In the multivariate analysis of the methods were the PLS-DA, VIP and the heat map. In general, ethanolic extracts have better antioxidant activity and higher values of total phenols. **RESULTS AND DISCUSSION:** The antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) ranged from  $77.44 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the reproductive stage 1 ethanolic extract (E1R1) to  $950.31 \mu\text{g mL}^{-1}$  for the hexane extract of the commercial product (CH). The values of total phenols vary from  $12.95 \text{ mg EAG g}^{-1}$  for ethanol extract with commercial product ethanol to  $46.14 \text{ mg EAG g}^{-1}$  for ethanol extract in reproductive stage 1. The extract with ethyl acetate reproductive stage 1 (EAR1) showed better antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The EAR1 extract showed the highest cytotoxic activity, as it managed to decrease the viability of the C6 tumor line ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) by 40.74%. Thirty metabolites have been identified. **CONCLUSION:** Although some studies present the

biological activities of *Zea mays* L. extracts, this one was the pioneer in presenting a global metabolomic evaluation of extracts with different polarities and correlating the results of antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities with the metabolites in the extracts. Rhamnose, yiamolose B, 2-keto-L-gluconic acid, glucose, lactic acid, glycolic acid are the metabolites most correlated with biological activities. The use of solvents, ethyl acetate and ethanol, influenced the metabolomic profile of the extracts, EAR1, E1R1 and E2R3, and these higher biological activities when compared with hexane extracts. The extracts in the reproductive phenological stage 1 important metabolomic profile for the biological activities tested in this study when compared to the reproductive phenological stage 2. The extracts obtained from their own natural heat greater biological activities when compared with the commercial samples.

Keywords: Corn silk, Metabolomics, Murine glioma C6.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estádio vegetativo de <i>Zea mays</i> (L.).....	29
<b>Figura 2</b> - Estádio reprodutivo do milho <i>Zea mays</i> (L.).....	30
<b>Figura 3</b> - Estigma de <i>Zea mays</i> (L.).....	31
<b>Figura 4</b> - Modelo de maceração para obtenção dos extratos do Estigma de milho ( <i>Zea mays</i> L.) .....	56
<b>Figura 5</b> - Atividade antioxidante de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. <i>in natura</i> R1, <i>in natura</i> R3 e comercial (IC <sub>50</sub> ).....	68
<b>Figura 6</b> - Teor total dos compostos fenólicos de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. ( <i>in natura</i> R1, <i>in natura</i> R3 e <i>in natura</i> comercial.....	69
<b>Figura 7</b> - Viabilidade da linhagem de glioma murino (C6) .....	70
<b>Figura 8</b> - Microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6.....	71
<b>Figura 9</b> - Análise de variância geral.....	78
<b>Figura 10</b> - Validação cruzada do PLS-DA geral.....	79
<b>Figura 11</b> - PLS-DA geral .....	80
<b>Figura 12</b> - Agrupamento hierárquico representado no mapa de calor dos dados gerais.....	82
<b>Figura 13</b> - Análise de variância dos metabólitos considerando o efeito do solvente.....	84
<b>Figura 14</b> - Validação cruzada do PLS-DA que avaliou a influência dos solventes na separação das amostras.....	84
<b>Figura 15</b> - PLS-DA considerando a influência dos solventes.....	85
<b>Figura 16</b> - Importância das variáveis na projeção, considerando a influência dos solventes	86
<b>Figura 17</b> - Plotagem de vulcano, considerando os estádios fenológicos.....	88
<b>Figura 18</b> - Validação cruzada do PLS-DA considerando os estádios fenológicos .....	89
<b>Figura 19</b> - PLS-DA considerando a influência dos estádios fenológicos .....	90
<b>Figura 20</b> - Importância das variáveis na projeção, considerando os estádios fenológicos ....	91
<b>Figura 21</b> - Plotagem de vulcano, considerando os extratos <i>in natura</i> e comercial.....	93
<b>Figura 22</b> - Validação cruzada do PLS-DA considerando a natureza <i>in natura</i> e comercial..	95
<b>Figura 23</b> - PLS-DA considerando a natureza <i>in natura</i> e comercial .....	96
<b>Figura 24</b> - Importância das variáveis na projeção, considerando a natureza <i>in natura</i> e comercial .....	98
<b>Figura 25</b> - Correlação entre os compostos fenólicos e e os metabólitos dos extratos .....	99
<b>Figura 26</b> - Correlação entre a atividade citotóxica contra células C6 e os metabólitos.....	100

<b>Figura 27</b> - Correlação entre a atividade antibacteriana frente ao <i>B. subtilis</i> e os metabólitos .....	101
<b>Figura 28</b> - Correlação entre a atividade antibacteriana frente ao <i>P. aeruginosa</i> e os metabólitos .....	102



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Compostos, estruturas químicas, atividades farmacológicas descritas em estudos fitoquímicos e farmacológicos do estigma de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	43
<b>Tabela 2</b> - Extratos do estigma de milho ( <i>Zea mays</i> L.) obtidos a partir das amostras e suas respectivas siglas .....	57
<b>Tabela 3</b> - Atividade antibacteriana dos extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. contra bactérias .....	69
<b>Tabela 4</b> - Metabólitos identificados nos extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. por CLAE-EM .....	73
<b>Tabela 5</b> - Metabólitos identificados nos extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. por CG-EM.....	77

## LSTA DE SIGLAS

<b>3T3-L1</b> .....	Linhagem de pré adipócitos murinos
<b>a.C</b> .....	Antes de Cristo
<b>ATP</b> .....	Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b> .....	Catalase
<b>Cg</b> .....	Carragenina
<b>CG-EM</b> .....	Cromatografia à gás acoplada a Espectrometria de Massa
<b>CG-EM</b> .....	Cromatografia à gás acoplada a Espectrometria de Massas
<b>CLAE-DAD</b> ...	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Matriz de Diodo
<b>CLAE-EM</b> ..	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
<b>CL-EM</b> .....	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
<b>Col IV</b> .....	Colágeno tipo IV
<b>DNA</b> .....	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b> .....	2,2-difenil-1- picril-hidrazil
<b>DPPH-H</b> .....	2,2-difenil-1- picril-hidrazil reduzido
<b>ERN</b> .....	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b> .....	Espécies Reativas de oxigênio
<b>ESI</b> .....	Ionização por Electrospray
<b>F2</b> .....	Segunda geração parental
<b>FN</b> .....	Fibronectina
<b>FRAP</b> .....	Capacidade de Redução do Íon Ferro
<b>GLUT 4</b> .....	Transportador de Glicose 4
<b>GPx</b> .....	Glutationa Peroxidase
<b>ICAM-1</b> .....	Molécula de adesão intercelular 1
<b>ICS</b> .....	Instituto de Ciências da Saúde
<b>IL-17</b> .....	Interleucina 17
<b>IL-1<math>\beta</math></b> .....	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b> .....	Interleucina 6
<b>IVP</b> .....	Importância da Variável na Projeção
<b>K<sup>+</sup></b> .....	Íon de potássio

<b>LabNq</b> .....	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
<b>LDH</b> .....	Lactato Desidrogenase
<b>LOOCV</b> .....	Validação Cruzada Deixando Um de Fora
<b>LPS</b> .....	Lipossacarídeo
<b>MDA</b> .....	Malondialdeído
<b>MTT</b> .....	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
<b>NADH</b> .....	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo reduzida
<b>OH</b> .....	Radical hidroxila
<b>ORAC</b> .....	Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados
<b>pH</b> .....	Potencial hidrogeniônico
<b>PLS-DA</b> .....	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados parciais
<b>PPAR-g</b> .....	Peroxissoma tipo gama
<b>Prxs</b> .....	Peroxirredoxinas
<b>Qe</b> .....	Carga elétrica
<b>R</b> .....	Estádio reprodutivo
<b>RNA</b> .....	Ácido ribonucleico
<b>SDS</b> .....	Duodecil Sulfato de Sódio
<b>SFB</b> .....	Soro Fetal Bovino
<b>SK-N-MC</b> .....	Linhagem celular de Neuroblastoma Humano.
<b>SNC</b> .....	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b> .....	Superóxido dismutase
<b>TBARS</b> .....	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TNF -<math>\alpha</math></b> .....	Fator de Necrose Tumoral
<b>TOF</b> .....	Tempo de Voo
<b>UFBA</b> .....	Universidade Federal da Bahia
<b>UV</b> .....	Ultravioleta
<b>V</b> .....	Vegetativo
<b>VEGF-<math>\alpha</math></b> .....	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
<b>WHO</b> .....	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Plantas medicinais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Atividade antioxidante .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Atividade citotóxica .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Metabolômica e plantas medicinais .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Milho.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.1 Origem .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.2 Descrição botânica .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.3 Cultivares de milho.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.4 Reprodução da planta de milho .....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.5 Fenologia da planta de milho.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Estigma de milho e seus compostos bioativos .....</b>	<b>30</b>
<b>2.7.1. Compostos fenólicos .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7.2 Terpenos .....</b>	<b>33</b>
<b>2.7.3 Esteróides .....</b>	<b>34</b>
<b>2.8 Estudos farmacológicos com o estigma de milho.....</b>	<b>34</b>
<b>2.8.1 Atividade antioxidante do estigma de milho .....</b>	<b>34</b>
<b>2.8.2 Atividade antiobesidade do estigma de milho.....</b>	<b>36</b>
<b>2.8.3 Atividades antidiabética do estigma de milho.....</b>	<b>37</b>
<b>2.8.4 Atividade anti-inflamatória do estigma de milho .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8.5 Atividades neuroprotetora do estigma de milho.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8.6 Atividades antifadiga do estigma de milho .....</b>	<b>39</b>
<b>2.8.7 Atividades antidiurética do estigma de milho.....</b>	<b>40</b>

2.8.8 Atividades tóxica do estigma de milho.....	41
3. Objetivos.....	55
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específico .....	55
4. Materiais e métodos.....	55
4.1 Obtenção das amostras e preparação dos extratos.....	55
4.2 Ensaio do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	57
4.3 Determinação de fenóis totais.....	58
4.4 Atividades antimicrobiana.....	58
4.5 Atividade citotóxica .....	59
4.5.1 Cultura de células de glioma murino (C6) .....	59
4.6 Teste de viabilidade celular .....	60
4.7 Análises de metabolômica .....	61
4.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	61
4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EM). .....	61
4.7.3 Processamento de dados e identificação de compostos .....	62
Identificação dos compostos por CLAE-EM.....	63
4.7.4 Normalização de dados da análise univariada e multivariada.....	63
4.7.5 Análise univariada.....	64
4.7.6 Análise multivariada .....	64
5. RESULTADOS .....	66
5.1 Atividade antioxidante .....	66
5.2 Quantificação de fenóis totais.....	68
5.3 Atividade antimicrobiana .....	69
5.4 Atividade citotóxica .....	70
5.4.1 Avaliação da morfologia celular e celularidade.....	70
5.5 Caracterização do perfil metabolômico.....	71

<b>5.6 Análises univariada e multivariada .....</b>	<b>78</b>
<b>5.6.1 Análise de variância (ANOVA) geral .....</b>	<b>78</b>
<b>5.6.2 Análise parcial discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA) geral .....</b>	<b>79</b>
<b>5.6.3 Mapa de calor geral.....</b>	<b>80</b>
<b>5.6.4 Influência do solvente na variação do metaboloma de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L.....</b>	<b>83</b>
<b>5.6.5 A influência dos estádios fenológicos na variação do metaboloma de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L.....</b>	<b>87</b>
<b>5.6.6 A influência das amostras <i>in natura</i> e comercial na variação do metaboloma de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L.....</b>	<b>92</b>
<b>5.6.7 Correlação entre as atividades biológicas e os metabólitos .....</b>	<b>99</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>Os extratos <i>in natura</i> apresentaram uma maior concentração de carboidratos e derivados no metaboloma de extratos do estigma de <i>Zea mays</i> L. A ramnose está em alta concentração em todos os extratos que apresentaram .....</b>	<b>107</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm se mostrado cruciais para o tratamento de doenças. Cerca de 70.000 espécies de plantas já foram utilizadas pelo menos uma vez para fins medicinais (PAN et al., 2014). Estas plantas conseguem se defender do estresse biótico e abiótico sintetizando compostos de diversas classes químicas, conhecidos como metabólitos secundários (BALLHORN et al., 2009). Os metabólitos secundários são sintetizados por animais, plantas e microrganismos, ainda que não estejam de forma direta implicados nos processos fisiológicos cruciais à vida (LIU et al., 2016).

Diversos metabólitos secundários são sintetizados por plantas e os pesquisadores utilizam extratos de diversas espécies para estudos científicos que possivelmente contribuam para o tratamento de muitas doenças humanas (OURABAH et al., 2020; ANAND et al., 2017; DE SOUZA et al., 2020).

Os extratos de plantas possuem metabólitos secundários que pertencem às diversas classes químicas, como fenólicos, flavonoides, carotenoides (GUNATHILAKE; RANAWEERA; RUPASINGHE, 2018), saponinas (XU et al., 2016), esteroides (SULTANA, 2018). Alguns destes metabólitos possuem atividade antioxidante (ALVARADO-MARTINEZ; ADITYA; BISWAS, 2019), anticancerígena (AHAMED et al., 2020), antibacteriana (MANILAL et al., 2020), antifúngica (ZAHABI et al., 2020) e neuroprotetora (JUNSATHIA et al., 2018).

A atividade antioxidante de plantas medicinais é crucial. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), frente ao sistema de defesa antioxidante, pode causar diversas doenças em humanos principalmente doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ROJAS; BUITRAGO, 2018).

As plantas medicinais são utilizadas de forma alternativa no tratamento de algumas patologias. Mas esta medida alternativa advém de experimentos científicos que buscam identificar as atividades biológicas destas plantas. Uma destas abordagens engloba o teste de plantas contra microrganismos patogênicos. O surgimento de micróbios patogênicos resistentes aos antibióticos tornou o tratamento convencional com medicamentos menos eficaz. Novos compostos antimicrobianos e antifúngicos são inescusáveis para combater esses micróbios patogênicos. Neste ponto os metabólitos secundários sintetizados por plantas são considerados uma fonte importante para novas descobertas de drogas (GUADIE et al., 2020; DIKHOBBA et al., 2019).

Os estudos científicos apresentam resultados que associam a utilização de plantas medicinais com vias vinculadas à evolução e aumento do câncer. Os resultados destes estudos propiciam a busca por agentes anticâncer, quimiopreventivos e quimioterápicos. O estudo científico das plantas medicinais no controle da proliferação e diferenciação celular vem sendo realizado há mais de 50 anos, mas os estudos que demonstram sua relevância como reguladores fisiológicos e farmacológicos no apoptose celular são recentes (SAFE; KASIAPPAN, 2016; CHANVORACHOTE et al., 2016).

O estigma de milho é parte do órgão feminino da planta, porção achatada do gineceu, localizada na parte extrema superior do carpelo e apresenta um líquido que auxilia a captação do grão de pólen. O estigma de milho vem sendo usado na medicina popular tradicional para o tratamento de cistite, edema, cálculos renais e distúrbios diuréticos. Entretanto a maioria dos produtores descartam o estigma após a produção de milho. Alguns artigos científicos mostraram atividades biológicas que estão associadas a classes, como: esteroides, alcalóides, saponinas, taninos e compostos de polifenóis (NURHANA; ROSLI E MOHSIN, 2012).

Atualmente estudos evidenciaram que o extrato do estigma do milho detém atividade anti-adipogênica, com base na sua capacidade de reduzir o acúmulo de lipídios na célula, diferenciação de adipócitos e lipogênese, mas também para otimizar a  $\beta$ -oxidação (PARK et. al., 2012).

O uso terapêutico do estigma de milho mais citado está relacionado ao tratamento de doenças do sistema urinário, seguido de sua utilização no tratamento da hipertensão e constipação. O uso medicinal de estigmas de *Zea mays* L. como diurético é citado em 93 livros de fitoterapia em 13 países (RAGHURAM; CASTRO-CHAVES, 2000).

O estigma de milho passou a ser um produto comercial, bastante reconhecido pela medicina popular e pela alopatia tradicional como um diurético moderado auxiliando na eliminação de cálculos renais. Adicionalmente, os estigmas do milho são empregados para o tratamento da hiperplasia de próstata, cistite, gota e nefrite crônica (MCINTYRE et al., 1993).

Entretanto, há carência de estudos científicos que identifique e quantifique os metabólitos do estigma de milho numa avaliação global e correlacione-os com as ações farmacológicas. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar as atividades biológicas de extratos do estigma de milho; realizar avaliação metabolômica destes extratos e utilizar técnicas de análise multivariadas para correlacionar os metabólitos com as atividades testadas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

O reino plantae é composto por plantas autotróficas, pluricelulares e eucariontes (TLILI; SARIKURKCU, 2020; UKWUBILE et al., 2020; TUŠEK et al., 2020; HAZRA et al., 2019). Estas plantas têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois são delas que se retiram numerosas substâncias orgânicas bioativas. O uso tradicional das plantas medicinais tradicionais demonstra um papel proeminente nos sistemas de cuidados médicos de muitos países (GIANNENAS et al., 2020; ULLAH et al., 2020; ANYWAR et al., 2020; SUÁREZ, 2019).

Durante muito tempo os metabólitos secundários presentes nas plantas não eram considerados como alvo de pesquisa. Porém, atualmente sabe-se que muitas dessas substâncias estão ligadas aos mecanismos que possibilitam a adequação do produtor a seu meio e a atividades biológicas (THAKUR et al., 2019).

A concentração dos metabólitos secundários está associada às oscilações temporais e espaciais. Apesar da existência de um controle genético a expressão pode sofrer transformações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GAO et al., 2020; BHATTACHARYA, 2019; TAKSHAK; AGRAWAL, 2019; JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2018).

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência das plantas, pois a produção destes metabólitos proporciona adaptações que favorecem à proteção contra herbívoros, patógenos e diversos estresses ambientais (MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020). Estes metabólitos secundários possuem uma variedade de funções nas plantas e sua importância ecológica tem relação com efeito medicinal para os seres humanos (GARCÍA-LARA; SERNASALDIVAR, 2019).

Muitos estudos farmacológicos com plantas estão sendo realizados em diversos países com intuito de identificar plantas que possuam compostos bioativos previamente estudados em outras espécies e também novas moléculas com atividades biológicas benéficas à saúde humana (PARK; BAE; OH, 2020; KALTBACH et al., 2020; MAJOLO et al., 2019).

A população brasileira possui uma herança cultural no uso de plantas medicinais para tratar diversas patologias agudas e crônicas. Esta prática, em nível mundial, impulsionou as indústrias farmacêuticas a buscar por compostos bioativos. A literatura científica apresenta um relatório considerável sobre o avanço na biotecnologia de plantas medicinais e seus

constituintes na prevenção de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2020; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; SOFOWORA, 2013).

Os estudos científicos demonstram que as atividades farmacológicas encontradas em plantas medicinais advêm de metabólitos que apresentam atividade antioxidante (SARIKURKCU et al., 2020; GÓMEZ-MARTÍNEZ et al., 2020), antimicrobiana (GULUMA et al., 2020; BOEIRA et al., 2020) e citotóxica (ELSA; SREEJA; PRIYA, 2020; PHAM et al., 2018).

As plantas medicinais, como por exemplo: *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill possui atividade antioxidante (ANTUNES-RICARDO et al., 2020), *Vaccinium macrocarpon* possui atividade antibacteriana (DUBREUIL et al., 2020). Neste contexto é cada vez maior os estudos farmacológicos que advêm das plantas medicinais com o intuito de definir o perfil químico de espécies de plantas e suas atividades biológicas (ZAHN et al., 2019; ZHANG et al., 2020a).

## 2.2 Atividade antioxidante

O oxigênio guarda um papel essencial na complexa evolução da vida na Terra, sobretudo devido à conformidade bioquímica entre a fotossíntese e a respiração aeróbia que preserva o equilíbrio na biosfera do planeta. Organismos aeróbios utilizam o oxigênio para produzir adenosina trifosfato (ATP), ou seja, para gerar a energia necessária para a manutenção da vida (CALBET et al., 2020; VANLERBERGHE et al., 2020).

A oxidação é uma parcela indispensável da vida aeróbica e do metabolismo celular originando radicais livres de modo natural ou por uma disfunção biológica. Os radicais livres apreentam elétron desemparelhados no centro de átomos de oxigênio e nitrogênio e são chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CAGNIN; CHEMELLO; AHMETOV, 2019; MAREMONT et al., 2019; CHOLEWA; NEWMIRE; ZANCHI, 2019; SIHEM et al., 2020).

A síntese excessiva de radicais livres ou deficiência de antioxidantes proporciona prejuízo aos organismos aeróbicos, como, lesões em células e tecidos, proporcionando modificações macromoleculares nas proteínas, lipídios e DNA, configurando o que é conhecido como estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2017). O estresse oxidativo pode colaborar para o surgimento de diversas doenças, como câncer (ABUDAWOOD et al., 2020), distúrbios neurodegenerativos (ELFAWY; DAS, 2019) e doenças cardiovasculares (DAIBER; CHLOPICKI, 2020).

As doenças degenerativas têm como importante fator causal a exposição ao estresse oxidativo devido à uma pausa na sinalização redox e controle do estresse oxidativo (ZHAO et al., 2020; ZHANG, et al., 2019; FERREIRA et al., 2017). Entretanto, os antioxidantes induzem mecanismos que controlam os efeitos deletérios produzidos pela grande produção de radicais livres (RAJABPOOR; GHADERIAN; SCHAT, 2019).

Os mecanismos de defesa frente aos danos que advém da produção de radicais livres podem ser enzimáticos e não enzimáticos (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018; DUBEY et al., 2020). Os enzimáticos são antioxidantes endógenos e compreendem o superóxido dismutase (SOD), o qual estimula através da catalase a reação de desproporção do ânion superóxido ao peróxido de hidrogênio e oxigênio (OMORUYI et al., 2020). A catalase (CAT) (FERNANDES et al., 2019), glutathione peroxidase (GPx) (JIN et al., 2020), glutathione reductase (GR) (SANNASIMUTHU et al., 2019) e peroxirredoxinas (Prxs) tornam neutras a peroxidação de hidrogênio, produzindo água e molécula de oxigênio (HAN et al., 2020).

Os antioxidantes não enzimáticos endógenos estão no plasma sanguíneo, ceruloplasmina, ferritina, transferina e albumina e atuam contra os radicais livres ligando íons de metais de transição (SHANG et al., 2020; ZHANG et al., 2019; LAZOU et al., 2020). Há também os antioxidantes alimentares, como vitamina E, vitamina C, carotenoides, minerais como zinco, manganês, cobre, selênio e polifenóis, como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (SYTAŘOVÁ et al., 2020; LEVENSON, 2020).

Os compostos fenólicos são conhecidos como metabólitos sintetizados biogeneticamente a partir do ácido chiquímico e policetídeos, cuja estrutura consiste em um anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxilas. Existem muitos estudos científicos que mostram que os extratos de plantas possuem diversas atividades biológicas que melhoram à saúde por meio da grande variedade de moléculas que agem contra os radicais livres, como fenólicos, antocianinas e carotenoides (GUNATHILAKE; RANAWEERA; RUPASINGHE, 2018).

Vários métodos são viáveis para a elucidação da atividade antioxidante de extratos vegetais ou substâncias isoladas, como co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sequestro do peróxido de hidrogênio, sequestro do radical peroxil (método ORAC), sequestro do radical superóxido - xantina oxidase, sequestro do ácido hipocloroso e sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (ALVES et al., 2010). O método de sequestro do DPPH é frequentemente utilizado e leva em consideração a reação química de oxirredução. Na presença

de um agente redutor com possibilidade de doar um elétron a cor púrpura tende a mudar para o amarelo e a medida da absorvância é realizada à 515 nm.

O DPPH é um radical livre consolidado pela ressonância do elétron desunidos que afasta a sua dimerização e inativação como radical livre. Quando na configuração reduzida ele expõe coloração divergente da oxidada e possibilita a detecção dos processos de oxirredução de substâncias potencialmente antioxidantes. Quando o material em análise detém determinada natureza antioxidante ele reage com o DPPH dando origem ao formato reduzido do reagente (DPPH-H). A redução provoca a alteração de sua coloração passando da cor violeta para amarelada (KANDI; CHARLES, 2019).

### 2.3 Atividade antimicrobiana

As bactérias, fungos, vírus e protozoários proporcionam problemas de grande dimensão à saúde humana quando invadem o sistema biológico humano. Muitos destes microrganismos causam diversas doenças infecciosas que trazem muitos malefícios à saúde humana (ANTABE; ZIEGLER, 2020; COLE; KRAMER, 2016).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva que pertence à microbiota humana ocasionando doenças como: infecção alimentar, pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (VANEGAS et al., 2020; VANHECKE et al., 2019).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa presente na água, no solo e se reproduz de forma eficiente em ambientes úmidos. A maioria dos casos de infecção por esta bactéria envolve pacientes hospitalizados que possuem imunossupressão subjacente (EKLÖF et al., 2020; DERAKHSHAN; HOSSEINZADEH, 2020; ZAMUDIO et al., 2019).

A *Salmonella typhimurium* é uma bactéria gram-negativa transmitida através da ingestão de alimentos contaminados. Esta bactéria é o motivo principal de intoxicação alimentar em todo o mundo proporcionando variados sintomas gástricos, sendo a gastroenterite a mais prevalente (NADI et al., 2020). A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa encontrada no trato gastrointestinal e está relacionada à infecções intestinais e doenças extra-intestinais (DUBREUIL, 2020; VILA et al., 2016)

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva e considerada não patogênica. Esta bactéria é um agente que combate outros microrganismos, ou seja, é uma bactéria antagonica que pode produzir metabólitos com atividade antimicrobiana (SIDOROVA et al., 2020).

O *Bacillus cereus* é uma bactéria gram-positiva e pode causar intoxicação alimentar ao ser humano. Os estudos mostram que este microrganismo está distribuído no ambiente e quando

são expostos a algum estresse podem produzir esporos, o qual possibilitam patologias que acometem o estômago e intestino. Os indivíduos que possuem a grande quantidade desta bactéria cursam com diarreia e vômito (HUANG; FLINT; PALMER, 2020).

O *Micrococcus luteus* é uma bactéria gram-positiva e está presente no meio ambiente podendo ser encontrada na epiderme de humanos de forma transitória. Esta bactéria é frequentemente usada para produção de metabólitos que combatem micróbios. Entretanto, pode proporcionar infecções em pacientes imunodeprimidos (NWACHUKWU et al., 2019; PEKALA et al., 2018).

O *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria gram-positiva encontrada na epiderme e mucosas dos humanos. Tem sido considerada por muito tempo como microrganismo inofensivo. Entretanto, é oportunista e se aproveita de episódio de imunossupressão para se proliferar. Essa bactéria é um agente patogênico encontrado com frequência em pacientes que sofrem com infecções hospitalares (DONG et al., 2019).

A *Candida albicans* é um fungo diploide encontrado no trato intestinal humano, mas pode se deslocar quando algum indivíduo possui uma patologia imunossupressora. Esse agente microbiano pode se deslocar do intestino para a corrente sanguínea e atingir órgãos. A *Candida glabrata* é um fungo haploide, saprófito e convive no trato gastrointestinal, órgão genital e vias respiratórias. Este é um agente fungo oportunista que acomete indivíduos imunossuprimidos (MORENO et al., 2019; MAURYA; SEMWAL; SEMWAL, 2020).

A utilização aumentada de antibióticos atinge a saúde humana, e o uso frequente, e muitas vezes indiscriminado dos medicamentos, ocasiona o aumento da resistência destes antimicrobianos frente aos microrganismos (ANAND et al., 2020; ZHAN et al., 2020).

Em razão da resistência de patógenos aos antimicrobianos é indispensável a pesquisa de novos agentes para o tratamento de infecções. Drogas formadas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais utilizadas na medicina popular são capazes de promover fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos (ROUMY et al., 2020).

Diversos estudos demonstraram tratamento de doenças através de plantas medicinais. Entre as patologias tratadas estão as infecções causadas por microrganismos. Muitos extratos de plantas possuem atividade antimicrobiana comprovada através de testes que oferecem confiabilidade científica (ALEKSIC; KNEZEVI, 2019; OGBOLE; SEGUN; FASINU, 2018; WANG et al., 2016; AKINPELU et al., 2015).

A atividade antimicrobiana foi identificada no extrato metanólico da folha da *Salacia macroperma*, frente ao *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* (MAHENDRA et al., 2020).

O extrato metanólico do caule da *Salsola kali* L. apresentou atividade antibacteriana e antifúngica frente à *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *C. glabrata*. Ambos os testes antimicrobianos realizados com os extratos de plantas utilizaram o método de microdiluição em caldo (BOULAABA et al., 2019).

O método de microdiluição emprega pequenos volumes de caldo que são inseridos às placas de plástico estéreis específicas para microdiluição. As quais possuem poços de fundo redondo ou cônico. Este método é utilizado para realizar um screening da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, substâncias puras e extratos de plantas (KNEZEVIC et al., 2018).

Uma das formas de apresentar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas considera a determinação de uma mínima quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste (CIM). O método de microdiluição em caldo é um dos métodos mais conhecidos para a avaliação da atividade antimicrobiana em plantas (SATOH et al., 2019).

A densidade bacteriana é indicada por turvação, desse modo, quando não existe crescimento microbiano o meio se mantém límpido, quando sim, o meio fica turvo. Conseqüentemente, o grau inibitório tem relação com a turbidez do meio e pode ser aplicado para avaliar a atividade antimicrobiana de amostras polares, apolares, além disso, é simples e rápido. As principais vantagens deste método é a sensibilidade do método a pequenas quantidades de amostras, reprodutibilidade dos resultados e produção de resultados quantitativos (VEIGA et al., 2019).

## **2.4 Atividade citotóxica**

A busca por plantas medicinais para tratar patologias vem aumentando em diversos países, pois normalmente as plantas apresentam uma toxicidade menor em relação às drogas sintéticas. Entretanto, um grande acervo de estudos científicos mostram o risco tóxico associado ao uso de plantas para células humanas (BORAH; BANIK, 2020; TWILLEY et al., 2017; HAO, 2019).

As pesquisas científicas que avaliam a citotoxicidade são de grande relevância, pois estabelecem a atividade tóxica de metabólitos isolados e extratos de plantas. O nível mínimo

de toxicidade as vezes é negligenciado no uso tradicional, mas é crucial para a produção de um medicamento seguro (ZHANG et al., 2020).

A literatura científica vem demonstrando que os metabólitos ou extratos que advém de plantas podem ter atividades tóxicas frente às células cancerígenas (ABUBAKAR et al., 2020; LALITHA et al., 2020).

O câncer é conhecido como neoplasia maligna devido ao crescimento progressivo e sem normalidade de células tumorais que pode surgir na maioria dos órgãos ou tecidos do corpo. Esta condição clínica é a segunda principal causa de morte no mundo e correspondendo à cerca de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (WHO, 2018).

O câncer do Sistema Nervoso é a causa da morte de 175.000 pessoas por ano (WHO, 2020). Considerando todos os tipos de cânceres que acomete o SNC, encontramos os tumores que acometem as glias. Esta célula tem como principal função nutrir os neurônios (SUVÀ; TIROSH, 2020).

O glioma é o tumor cerebral primário mais frequente, incluindo ependimoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma misto, astrocitoma. O glioblastoma multiforme é um astrocitoma anaplásico, sendo um dos tumores mais agressivos que atinge o cérebro de humanos. Este tipo de tumor maligno corresponde a metade dos tumores primários do sistema nervoso central (OSTROM et al., 2019). O glioblastoma corresponde a cerca de 80% dos gliomas, além de ser responsável por 50% dos tumores primários do sistema nervoso central (LOUIS et al., 2016).

O teste de citotoxicidade direcionado às células cancerígenas é de extrema relevância para os estudos sobre o câncer, visto que um perfil de toxicidade celular atenuado em células não cancerígenas pode indicar a não aleatoriedade do agente frente às células saudáveis (DILSHAD et al., 2020; GRAÇA et al., 2019; BEEBY et al., 2020).

Existem variados ensaios de toxicidade que possivelmente podem ser empregados. Dentre algumas formas de avaliar a toxicidade, é muito utilizada a exposição de substâncias às células tumorais e avaliar os aspectos da morfologia celular e diferenciação de células. A linhagem C6 é uma das mais utilizadas em estudos neuroquímicos. Sua terminologia C6 faz referência ao sexto clone do agente alquilante N-nitrosometilureia após a injeção desta substância nos ratos. Após a injeção do agente foi observado que as células continham proteínas S-100, esta proteína é encontrada no cérebro de vertebrados de forma exclusiva. Os tumores cerebrais induzidos pelo uso da N-nitrosometilureia possuem grande semelhança com os astrócitos e possuem a proteína S-100, sua quantidade aumenta de acordo com o

desenvolvimento tumoral. Cerca de cinco estirpes clonal distintas foram estudadas e apenas a estirpe C6 contém uma quantidade considerável da proteína (BENDA et al., 1968).

A atividade citotóxica das drogas em cultura de células tumorais pode ser investigada por meio de uma avaliação microscópica, através da análise dos danos ocorridos às células em cultura e através da viabilidade celular. O ensaio do MTT se fundamenta na medida do dano causado pela droga no metabolismo celular de glicídios usualmente através da atividade de desidrogenases.

A atividade da célula é calculada pela atenuação do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium (MTT). As reações com o MTT são utilizadas para identificar a atividade de desidrogenases em células com viabilidade. O sal de tetrazólio não reage de forma direta com as desidrogenases, mas com os derivados da reação NADH ou NADPH que reduzem o MTT para a formazan (SKEHAN et al., 1990; MOSMANN, 1983; CARMICHAEL et al., 1987).

## **2.5 Metabolômica e plantas medicinais**

Com o crescimento das pesquisas científicas que viabiliza o estudo de genes, proteínas e metabólitos, e a evolução na descoberta de novos fármacos, do controle e biomonitoramento de doenças, se faz imprescindível o desenvolvimento de ferramentas de investigação das alterações biológicas que ocorrem nos seres vivos relacionadas à fatores genéticos, ambientais e intervenções externas (ADAMSK, 2020).

As ciências ômicas abrangem áreas científicas que apresentam uma ampla diversidade de disciplinas. Tendo como alvo o estudo robusto das características das estruturas de dessemelhantes famílias de moléculas em diversos organismos com o objeto de compreender a ação dos organismos e suas alterações biológicas. Logo depois da descoberta do genoma os estudos reverteram-se à elucidação das funções de todos os genes, bem como a caracterização de suas interações com fatores ambientais. Em vista disto, surgiu o transcriptoma (conjunto dos transcritos-RNA), o proteoma (conjunto de proteínas) e o metaboloma (conjunto de metabólitos). Os metabólitos são produtos de processos celulares e sua determinação pode ser considerada a última resposta de um sistema biológico que sofreu alterações (MANZONI, 2018).

O metabolismo celular é realmente entendido como uma rede complexa de reações bastante ordenadas e interconectadas, da forma que mesmo pequenas alterações como a redução na concentração ou atividade de uma enzima podem causar modificações concomitantes na



concentração de centenas de metabólitos. Essas possíveis transformações são estudadas na metabolômica (SETHI et al., 2017).

Metabolômica é definida como uma área da ciência que utiliza ferramenta para a identificação de metabólitos em condições qualitativas e quantitativas em um sistema biológico (SLISZ et al., 2012). A metabolômica é uma das "Ômicas" na biologia do sistema que vem se desenvolvendo para entender as alterações de nível molecular em diversas condições (ZHANG; HATZAKIS; PATTERSON, 2016).

As análises metabolômicas podem ser classificadas como: alvo (do inglês, targeted metabolomics) e determinada como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos selecionados de forma prévia pertencentes a uma estipulada classe química, ou que estejam relacionados à rotas metabólicas específicas, e metabolômica global (do inglês, untargeted metabolomics) que se baseia na análise qualitativa de um grande número de metabólitos, relativos à variadas classes químicas compreendidas no sistema biológico em estudo. (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

A metabolômica expõe um enorme desafio analítico, especialmente por causa da diversidade das propriedades químicas, físicas e concentração dos metabólitos encontrados em amostras biológicas. Os metabólitos podem apresentar variadas configurações e composições químicas, englobando compostos muito polares a compostos apolares. Obter um método analítico qualificado para abranger todas as classes de metabólitos em uma única análise é um trabalho impossível (VILLAS-BÔAS; BRUHEIM, 2007).

A espectrometria de massas é a técnica de análise mais utilizada na metabolômica por ser bastante sensível e viabilizar agilidade nas análises por ser bastante seletiva. O modo de utilização para esta técnica se faz através da infusão direta dos extratos, entretanto há problemas de supressão de ionização dos sinais adquiridos, mas este problema pode ser minimizado por meio da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência e da cromatografia gasosa (MIRNEZAMI, R. et al., 2014).

A cromatografia à gas acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é uma das técnicas de análise de maior utilização em pesquisas na metabolômica, fornecendo dados que se repetem muitas vezes, demonstrando robustez. A análise de metabólitos voláteis por headspace é constantemente utilizada para alcançar a fração volátil do conjunto de todos os metabólitos do sistema biológico. Contudo, grande parte de metabólitos que formam o metaboloma precisam ser derivatizados, para alcançar em temperaturas atenuadas a volatilidade. A derivatização é um procedimento que envolve alterações de composto químicos com o intuito de produzir novos

produtos com melhores propriedades cromatográficas. O uso de CG-EM demonstra uma grande vantagem que é resultado da elaboração de bibliotecas de espectros exibindo elevada confiabilidade na identificação dos metabólitos, outro dado fornecido é o tempo de retenção e o padrão de fragmentação alcançado em consequência da ionização por elétrons (WECKWERTH; KAHL, 2013; KOEK et al., 2011)

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) tem ganhado grande notoriedade nas pesquisas envolvendo análises de metabolomas (THEODORIDIS et al., 2012; PEZZATTI et al., 2020). Essa técnica se mostra robusta, sensível e seletiva. No que tange a cobertura de identificação de metabólitos secundários, a CLAE-EM é considerada uma técnica abrangente, pois promove o mapeamento químico extenso de um metaboloma. Esta cobertura é consequência da grande variedade de fases estacionárias à disposição, possui variadas formas de separação, como a eluição em fase reversa, com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica (THEODORIDIS et al., 2019).

Avalia-se que existam mais de 200.000 metabólitos em plantas (ERNST et al., 2014). Levando em consideração esta variedade de metabólitos secundários contidos em cada planta, a análise do metaboloma de plantas é crucial para o entendimento da sua composição química, otimização na produção, cultivo e possíveis testes relacionados às atividades biológicas (FERNANDEZ et al., 2016).

Os estudos de avaliação metabolômica global do estigma de milho (*Zea mays* L.), objeto de estudo dessa dissertação, são escassos. A maioria das análises metabolômicas abordada nos estudos até então são classificadas como alvo (do inglês, *targeted metabolomics*). Mesmo sendo quantitativa, este tipo de estudo direciona à análise para determinados metabólitos presente em uma classe e estes possuem rotas metabólicas comuns.

A análise metabolômica global é muito importante na busca de uma análise de diversas classes químicas contidas numa espécie. Levando em consideração a carência da aplicação da análise metabolômica global em estigma de milho. Este estudo apresenta a aplicação de técnicas metabolômicas para mapear grande parte do metaboloma do estigma de milho. As técnicas foram: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM) para realizar este mapeamento químico mais abrangente.

## **2.6 Milho**

### **2.6.1 Origem**

O milho se originou nas terras altas do México entre 7.000 e 10.000 anos atrás. Evidências arqueológicas mostraram que o milho foi cultivado no ano 2000-2500 aC. em um sítio arqueológico com o nome "Nac Neish". Essa é a primeira evidência paleoetnobotânica de sua domesticação, localizada na parte sul do estado de Tamaulipas no México. Existem outros sítios arqueológicos valiosos localizados nos estados de Puebla, Oaxaca e México. A *Zea mexicana* e *Zea perennis* são espécies mais antigas registradas há 5000 anos aC. Essas espécies foram encontradas nos sítios arqueológicos chamados "La Playa" e "Nevada", localizados no vale de Tehuacan. Dois tipos de planta do milho chamados Chalco e Balsas foram encontrados no oeste do México, situados em altitudes altas e baixas, respectivamente (GALINAT, 1988; CUEVAS SÁNCHEZ, 2011; SERNA-SALDIVAR, 2015).

### **2.6.2 Descrição botânica**

A *Zea mays* L. é a nomenclatura científica de uma espécie domesticada pertencente à divisão: Angiospermae, reino: Plantae, divisão: Magnoliophyta, classe: Liliopsida, ordem: Poales, família: Poaceae, gênero: *Zea* e epíteto específico: *mays*. Estes podem ser milho doce, ceroso e roxo. As cultivares são abundantemente cultivadas e utilizadas na indústria de alimentos (ANDERSON; BROWN, 1952).

### **2.6.3 Cultivares de milho**

A cultivar é uma forma de planta cultivada e possui um genótipo e fenótipo distintos. No Brasil são utilizadas variedades e híbridos. As variedades são adquiridas através do cruzamento de plantas da mesma linhagem. A variedade é um grupo de plantas com características comuns e apresentam estabilidade no material genético devido ao cuidado na reprodução dessas plantas para que o cruzamento não ocorra (ORTON, 2020)

Os híbridos são adquiridos através do cruzamento delineado entre diferentes plantas de linhagem pura. Os híbridos mais utilizados no Brasil são: híbridos de variedades que são produtos de cruzamento genético entre duas variedades e aqueles de linhagem e híbridos de linhagem, este é o mais comercializado, sendo separados em três tipos diferentes. Híbrido simples: cruzamento entre duas linhagens puras; híbrido triplo: cruzamento entre uma linhagem

pura e e um híbrido simples; híbrido duplo: cruzamento entre dois híbridos simples (SANTOS et al., 2020).

Existe uma diversidade em relação aos tipos de sementes utilizadas no cultivo no mercado. Os híbridos simples são os mais utilizados no comércio. Tendo em vista a demanda das indústrias e a necessidade do pequeno e médio agricultor. Muitos estudos foram realizados com o objetivo de melhorar geneticamente as sementes produzidas pelos híbridos, levando em consideração a escolha do tipo de semente para uma região em crescimento, melhor gerenciamento cultural e fatores ambientais que influenciam a expressão do gene da semente e, conseqüentemente, nas características da planta, e mais intrinsecamente, sua composição química (WANG et al., 2020; REZENDE et al., 2020; ALBUQUERQUE et al., 2008).

#### **2.6.4 Reprodução da planta de milho**

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie monoclina onde as flores estaminadas (masculina) está localizada na borla, enquanto a flores pistiladas (feminina) está localizada na espiga do milho. Esses órgãos aparecem como flores e são responsáveis pela reprodução da planta, a qual ocorre através da transferência do pólen para o estigma, esse processo é conhecido como polinização. Uma planta de milho pode se autofertilizar ou esse processo reprodutivo pode ser feito através da polinização cruzada, onde a transferência é feita de uma flor masculina de uma planta para outra da mesma espécie. A inflorescência masculina produz 25 milhões de grãos de pólen (os híbridos modernos têm cerca de 750.000 a 1 milhão devido ao tamanho menor das borlas) (DARRAH; MCMULLEN; ZUBER, 2019).

#### **2.6.5 Fenologia da planta de milho**

O crescimento e desenvolvimento de uma planta de milho seguem um padrão. No entanto, o intervalo de tempo entre as etapas de crescimento pode variar entre diferentes cultivares, ano agrícola, data de plantio e localização. Portanto, é necessário identificar os estádios de desenvolvimento da planta que podem estar no estágio vegetativo (V) e reprodutiva (R). Dentro do estágio vegetativo, há uma faixa de crescimento indicada por números que representam o número de folhas, por exemplo: estágio vegetativo (V1) a VN, que descreve a última folha deste estágio (ASSEFA et al., 2014).

##### **2.6.5.1 Estádio vegetativo**

O primeiro estágio dá início a emergência. Neste estágio a germinação geralmente ocorre entre quatro e cinco dias, mas a duração exata desse período depende diretamente de fatores ambientais. A formação do sistema radicular nodal começa nesse estágio e o alongamento das primeiras raízes inicia-se no estágio V1 e após o estágio V3 o crescimento é quase zero (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio V1 a primeira folha com colar aparece e a partir deste ponto até a floração (R1) os estádios vegetativos são determinados a partir da última folha desenvolvida. O meristema apical da planta fica abaixo da superfície do solo até o estágio V5. No estágio V2, as raízes nodais começam a crescer no subsolo (Figura 1) (RITCHIE; HANWAY 1989).

No estágio V3 as folhas são completamente desenvolvidas. No entanto, o ponto de crescimento ainda está abaixo da superfície do solo e o caule ainda está se formando. Nesse estágio, os pêlos radiculares do sistema nodal começam a emergir e o crescimento radicular seminal estagna. No estágio V5, cinco folhas estarão completas, há também o início emergência da espiga do milho e da borla. No estágio V4, predominam as raízes nodais que ocupam maior densidade do solo em comparação às seminais. As folhas ainda se desenvolvem no ponto de crescimento da planta (apical) (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio V6, a borla está acima do nível do solo, o caule está sendo esticado e o sistema radicular está crescendo. A falta de água neste estágio pode interferir negativamente no desenvolvimento das plantas, principalmente no armazenamento de açúcares (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio V9, há um grande desenvolvimento dos órgãos das flores, no entanto, o caule permanece esticado. Em contraste, a borla tem pouco desenvolvimento. Na transição para o estágio V10, a planta começa a crescer gradualmente, onde há um grande acúmulo de nutrientes que duram até o início do estágio reprodutivo. Após esse período, o crescimento foliar entre estádios ocorre em períodos mais curtos. Até o estágio de desenvolvimento foliar total, a taxa é de aproximadamente 2 a 3 dias por folha (Figura 1) (RITCHIE; HANWAY 1989).

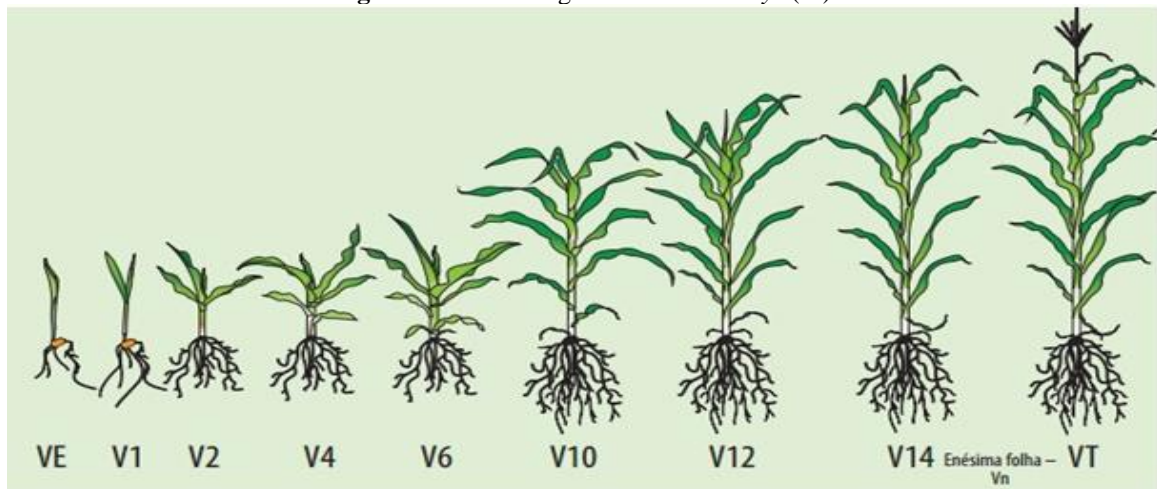
No estágio V12, os grãos têm seu tamanho definido. Se duas a quatro folhas básicas forem perdidas nesse estágio, isso comprometerá diretamente a produção. No estágio V17, os grãos são definidos por linha, e uma semana depois ocorre a floração (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio V15, o estigma de milho começa a emergir dos picos. Se o estresse hídrico ocorre quinze dias antes e após a floração, afeta diretamente a formação de grãos. No período subsequente, a margem livre já pode ser vista (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

O estágio V18 começa uma semana antes da floração. As raízes aéreas aparecem neste estágio e são responsáveis pela absorção de água e nutrientes. A falta de água neste estágio pode dificultar a emissão do estigma (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio de pendramento a transmissão da inflorescência masculina ocorre antes que o estigma do milho seja exposto, o intervalo de tempo entre eles pode chegar a 4 dias. O intervalo entre a fertilização e o primeiro estágio reprodutivo pode variar de acordo com a cultivar e os fatores ambientais (Figura 1) (MAGALHÃES et al., 1995).

**Figura 1-** Estádio vegetativo de *Zea mays* (L.).



Fonte: Fonte: K-State Research and Extension (2016).

### 2.6.5.2 Estádio reprodutivo

No estágio R1, o estigma de milho é totalmente visível na parte externa da espiga. Durante esse período o "cabelo" do milho retém o pólen para polinizar. A fertilização do óvulo ocorre após 24 horas de retenção de pólen. O estigma de milho cresce até ser fertilizado. Em todos os estádios os fatores ambientais são essenciais para o desenvolvimento da planta. Nesta etapa, a baixa umidade e altas temperaturas inviabiliza a polinização e conseqüentemente a produção de grãos (Figura 2) (RITCHIE; HANWAY, 1989; MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio R2, a espiga de milho está próxima do seu tamanho máximo. O acúmulo de amido nos grãos se inicia neste estágio. Neste estágio o estigma de milho começa a escurecer e secar (Figura 2) (RITCHIE; HANWAY, 1989; MAGALHÃES et al., 1995).

No estágio R3, os grãos têm um líquido mais amarelado demonstrando a transformação de açúcares menos complexos em um polissacarídeo. Além disso, é precisamente neste estágio que os fotoassimilados encontrados em outras partes da planta são transferidos para a espiga (Figura 2) (MAGALHÃES; 1995).

No estágio R4, os grãos se tornam mais pastosos e consistentes. Este estágio é atingido após 25 dias da emergência do estigma de milho. O acúmulo de amido e o ganho de peso dos grãos nesse estágio é constante, atingindo metade do peso que será atingido na maturidade fisiológica (Figura 2) (MAGALHÃES et al., 1995)

O estágio R5 é caracterizado pela formação de uma parte côncava na parte elevada do grão, mais conhecida como dente. É essencial saber que nem todos os genótipos terão o "dente", portanto o melhor parâmetro é observar a rigidez dos grãos (RITCHIE; HANWAY 1989, FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

O estágio R6 é alcançado 60 dias após a polinização. Nesse período os grãos atingem seu peso seco máximo e envelhecimento das folhas, garantindo uma aparência mais opaca. Esse estágio compreende o tempo ideal para a colheita. A umidade dos grãos pode variar entre os híbridos (Figura 2) (RITCHIE; HANWAY 1989, FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

**Figura 2** - Estádio reprodutivo do milho *Zea mays* (L.).



Fonte: K-State Research and Extension (2016).

## 2.7 Estigma de milho e seus compostos bioativos

O estigma de milho é parte da flor feminina de *Zea mays* L, fica no topo do fruto do milho, sendo considerado um subproduto obtido da produção de milho, descartado como lixo junto com outras partes do milho como resultado da falta de utilização. As principais classes químicas encontradas no estigma são: esteroides, sitosterol, estigmasterol, alcaloides, saponinas, ácidos graxos (EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007), flavonoides (SOSA et al., 1997; SNOOK et al., 1993) e outros fenólicos (NURHANA; ROSLI; MOHSIN, 2012; EBRAHIMZADEH et al., 2008).

Figura 3 - Estigma de *Zea mays* (L.).



Fonte: Ivone Lopes (2016).

Os metabólitos secundários desempenham um papel essencial nas plantas através da interação destas com o meio ambiente para sua sobrevivência. Estes metabólitos exercem um papel relevante para o desenvolvimento de medicamentos utilizados na medicina atual (SRIVASTAV; EGBUNA; TIWARI, 2020).

### 2.7.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam uma grande classe de metabólitos presentes na maioria das plantas. O estigma de milho possui diversos compostos fenólicos. O extrato metanólico do estigma de milho apresentou o teor de compostos fenólicos de 272,81 mg de EAG / 100 g, enquanto o extrato aquoso continha 256,36 mg de EAG 100 g, Através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (NURHANAN; ROSLI; MOHSIN, 2012). (NURHANAN; ROSLI; MOHSIN, 2012). Entretanto, em outra pesquisa que utilizou uma espécie número 280 foi de  $118,94 \pm 2,78 \text{ mg g}^{-1}$ . Esta extração foi realizada com etanol-água (1:1) e o teor fenólico foi determinado usando o (EBRAHIMZADEH; POURMORAD; HAFEZI, 2008).

Os diferentes genótipos de milho podem alterar a composição de seus compostos fenólicos. O estudo de Sarepoua et al. (2015) utilizou o método colorimétrico Folin-Ciocalteu e exibiu um teor significativamente maior de compostos fenólicos no estigma de milho do estágio reprodutivo 4, em relação ao estágio reprodutivo 6. O conteúdo fenólico total variou de  $26,5 \mu\text{g EAG g}^{-1}$  (milho ceroso branco, variedade WWC1 no estágio R6) a  $206,8 \mu\text{g EAG g}^{-1}$  (milho ceroso roxo, variedade PWC5 no estágio R4), nas amostras que utilizaram solventes metanólicos nas variedades de milho avaliadas.

No entanto, o estudo de Žilić et al. (2016) avaliado através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu apresentou teores de compostos fenólicos significativamente maiores em



relação ao resultado exposto no estudo de Sarepoua et al. (2015). O teor de compostos fenólicos nos estigmas de milho híbrido ZP foi mais elevado no estágio reprodutivo 1 (R1), em relação ao estágio reprodutivo 4 (R4). Considerando as plantas de milho híbridas estudadas (ZP Exp, ZP 555, ZP 341 e ZP 366), o maior teor de compostos fenólicos foi de  $8101,6 \pm 73,5$  mg de EAG  $100\text{g}^{-1}$  (ZP Exp – estágio R1) e o menor foi  $2093,9 \pm 215,7$  mg de EAG  $100\text{g}^{-1}$  (ZP 555 – estágio R4).

O conteúdo total de compostos fenólicos nos extratos etanólicos do estigma de milho avaliado através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu variou de  $21,40 \pm 7,47$  a  $13,41 \pm 4,78$  mg de EAG  $\text{g}^{-1}$  de extrato. O maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no milho doce (cultivar – SP: bicolor) e o menor teor foi identificado no milho ceroso (KT: AT55), ambos no estágio R3 (CHAIITTIANAN et al., 2016).

O conteúdo fenólico total do extrato etanólico do estigma de milho (cultivar YeDan-13 – estágio R6) avaliado através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu foi de 38,2 mg de EAG  $\text{g}^{-1}$ . (WANG; ZHAO, 2019).

Os flavonoides pertencem ao maior grupo de compostos fenólicos no estigma de milho. A estrutura genérica de um flavonoide consiste em dois anéis aromáticos conectados por um anel heterocíclico oxigenado conhecido como anel C. Diferentes estruturas no anel dos flavonoides os classificam como flavanois, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides (RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014).

Com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), alguns flavosídeos foram isolados e identificados no estigma de milho: ax-5-metano-3-metimidina (**1**), ax-4-OH-3-metoximidina (**2**), 7,4-di-hidroxi-3-metoxiflavona-2-O- $\alpha$ -L-ramnosil-6-C-fucosídeo (**3**), 2"-O- $\alpha$ -L-ramnosil-6-C-3"-desoxiglucosil-3'-metoxiluteolina (**4**), Ax-4"-hidroxi-3'-metoximisina (**5**), 6,4'-di-hidroxi-3'-metoxiflavona-7-O-glucosídeo (**6**) (REN; QIAO; DING, 2013; REN, 2018).

Alguns outros ácidos e derivados fenólicos, bem como derivados do ácido vanílico, também foram identificados por espectrometria de massas em cromatografia líquida em tandem (CL-EM /EM), como, vaniloil hexose (**7**), naringenina 4'-O-glucosídeo (**8**) (CHAIITTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017).

Através da análise CL-EM, foram identificados o ácido cafeico (**9**) e ácido p-cumárico (**10**). Dentre os ácidos cafeoilquínicos (**11**), os principais ácidos identificados foram respectivamente: ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA) (**12**), ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) (**13**) e ácido p-coumaroilquínico (P-CQA) (**14**) (ŽILIC et al., 2016).

O estudo de Yu et al. (2008) usando reação espectral em cromatografia em camada fina (CCF) identificou os flavonoides predominantes. As frações particionadas de acetato de etila de um extrato etanólico bruto do estigma de milho, mostraram luteolina (**16**), formononetina (**17**) e apigenina (**18**).

O estudo de Guo et al. (2004) mostrou que através da cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa foi possível identificar os flavonoides glicosídeos, incluindo a quercetina (**19**), maysina (**20**), apimaisina (**21**), estes foram os metabólitos majoritários. Vale ressaltar que a base populacional do estudo foi a segunda geração parental (F2), resultado de um cruzamento entre as linhas puras GE37 (P1A1) e 565 coletadas no estádio R1. A análise foi realizada com extrato etanólico.

A avaliação metabolômica do extrato etanólico do estigma de milho roxo, no estádio fenológico R3, através da CLAE, revelou a presença do ácido protocatecúico (**22**), ácido vanílico (**23**), ácido p-cumárico (**10**) e ácido hidroxicinâmico (**24**) (CHAITTIANAN et al., 2016). Os polifenóis foram definidos como os principais metabólitos do estigma de milho. Respectivamente, nesta ordem, antocianinas, quercetina (**19**), ácidos fenólicos e derivados (CHAITTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017). O conteúdo de antocianina de 1,57 e 192,96 mg de EGC 100 g<sup>-1</sup>, contribuiu para a cor rosa e púrpura. O conteúdo de quercetina (**19**) foi de 58,22 ± 1,34 mg g<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que neste estudo a quercetina foi um dos flavonoides majoritários presentes no estigma de milho iraniano,

### 2.7.2 Terpenos

Os terpenos são os principais compostos em diversas espécies de plantas e apresentam diversas funções biológicas. As plantas que possuem flores demonstram um teor maior de terpenos. Os egípcios começaram a usar esses metabólitos para fins religiosos, cosméticos e medicinais. (THOMPSON, 2005; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007; ZHOU; PICHERSKY, 2020; EL-GHORAB; EL-MASSRY SHIBAMOTO, 2007).

Alguns terpenos foram identificados no extrato do estigma de milho egípcio utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para obter o extrato foi utilizado o solvente diclorometano. Os principais constituintes foram, 6, 11-oxidoacoro-4-eno (**25**), citronelol (**26**), trans-pinocanfona (**27**), ledol (**28**), globulol (**29**), neo-iso-3-tujanol (**30**) e hidrato de cis-sabineno (**31**). Outros terpenos também foram identificados em concentrações mais baixas, como timol (**32**), cis-crisantol (**33**), tujopsadieno (**34**), 7-epi-R-selineno (**35**), o-cimeno (**36**), ácido isovalérico (**37**), (E)-hexen-2 (**38**), cubenol (**39**), tricicleno (**40**), alfa-pineno

(41), cânfora (42), acetato de citronelil (43), acetato de neoisodi-hidrocarveol (44), cis-carveol (45), viridiflorol (46), 1-epi-cubenol (47), p-cimeno-7-ol (48), selina-3,7 (11) -dieno (49), eugenol (50), verbena (51), sabineno (52), careno (53) cis-alfa-terpina (54), transcarveol (55), carvacrol (56), aromadendereno (57), acor-4-eno (6,11-óxido) (58), germacreno (B) (59), beta óxido de himachaleno (60) farnesol (61) (EL-GHORAB; EL-MASSRY SHIBAMOTO, 2007).

### 2.7.3 Esteróides

Fitoesteróis é um termo coletivo para esteróis e estanois vegetais com uma estrutura semelhante ao colesterol, diferindo apenas nas cadeias laterais. Eles são os componentes essenciais das paredes e membranas celulares das plantas. Os pequenos constituintes do óleo de milho, os fitoesteróis, são classificados em subgrupos: 4-desmetilsteróis, 4,4-dimetilesteróis, 4-monometilsteróis e sitosteróis. A classificação é baseada no número do grupo metil na posição C-4 (STUMPF, P; MUDD, J; NES, W, 1987).

## 2.8 Estudos farmacológicos com o estigma de milho

Especificamente na França, o estigma de milho é usado para diminuir gordura corporal (TSUDA et al., 2003; WANG et al., 2011). Além disso, foram lançados no mercado produtos à base de chá e cápsulas de folhas de milho com alegações de melhoria referente à redução da pressão arterial e cura de infecções do trato urinário.

Com evidência científica as atividades biológicas do estigma de milho têm sido relatadas na literatura, como: anti-diabético (GUO et al., 2009), diurético (VELAZQUEZ et al., 2005), inibição antiproliferativa induzida por lipopolissacarídeo (1) e (2), respectivamente, inibição da hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxana e efeitos hipolipidêmicos do polissacarídeo no estigma de milho (GUO et al., 2019)

A atividade antiadipogênese no estigma do milho foi investigada e a atividade esperada não foi evidenciada. Por outro lado, foi encontrada como uma rica fonte de fibras alimentares, antocianinas e flavonoides (CHAITTIANAN et al., 2016).

### 2.8.1 Atividade antioxidante do estigma de milho

O oxigênio é um composto abundante no planeta e responsável pela produção eficiente de energia em animais e plantas. A disparidade entre oxidação e a ação antioxidante de defesa

é causada por um desequilíbrio entre pró-oxidante e antioxidante. Este desequilíbrio condiciona à geração de espécies tóxicas de radicais. Os radicais livres são geralmente eliminados por antioxidantes e estimulam os níveis de enzimas antioxidantes (BJELAKOVIC et al., 2007).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos às biomoléculas como o DNA, causando câncer, bem como a doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (CICHO-LACH; MICHALAK, 2014).

O extrato de etanol do cultivar YeDan-13 mostrou uma atividade antioxidante através do ensaio DPPH com valor de IC<sub>50</sub> de 116.2 µg mL (WANG; ZHAO, 2019). De acordo com o trabalho de Zilic et al. (2016), utilizando o ensaio DPPH, avaliaram os estigmas de milho, em estágios diferentes de maturidade e obtiveram valores de IC<sub>50</sub> de 0,059 mg para o ZP 341, no estágio R1, que foi o mais antioxidante que o do estágio R4, com IC<sub>50</sub> de 0,180 mg.

O estudo de Chaiittianan et al. (2016), foram utilizados dois cultivares distintos: o estigma de milho doce (SP: Bicolor e SV: ATS5) e estigma de milho ceroso (KJ: Kaimook-49 e KT: Big white -852). As amostras foram coletadas no estágio R3 e foi realizado o teste de determinação do poder de redução do ferro (FRAP). Este teste definiu o potencial de extração com base na redução de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup>. Também foi utilizado o ensaio DPPH que avalia a capacidade de doação de hidrogênio ou a eliminação de radicais. Os resultados dos dois testes mostraram a atividade antioxidante. A maior atividade foi identificada nos extratos SP (0,44 ± 0,08 mg Fe<sup>2+</sup> eq g extrato e 11,74 ± 1,21 mg Vit C eq g extrato) quando comparado ao SV, KJ e KT, respectivamente. A atividades antioxidante encontrada nos extratos estavam relacionadas às concentrações totais de fenólicos e flavonoides.

O estudo de Vranješ et al. (2016) utilizando ratos (*Mus musculus* albino variedade NMRI), analisou a atividade antioxidante do homogenato de rim através do ensaio de DPPH, além de ensaios enzimáticos, glutatona e peroxidação lipídica. Para esta avaliação foi utilizado a superóxido dismutase (SOD), esta enzima foi determinada em alíquotas pelo método de Misra e Fridovics (1972) com base na inibição da transformação da adrenalina em adrenocortical a pH 10,2, a qual foi maior nos rins de camundongos tratados com extrato de estigma de milho (16,03 U mg de proteína em relação às demais plantas) em comparação com as demais plantas utilizadas neste estudo (mirtilo e salsa) (MATKOVICS et al., 1977). A avaliação dos rins de camundongos tratados com extrato do estigma de milho na concentração de 75 nmol de guaiacol mg de proteína e da a glutatona peroxidase (GSH-Px) usando hidroperóxido de cumeno nos rins de animais que ingeriram estigma de milho (75,18 nmol GSH mg de proteína) foi considerada significativa. Entretanto, os rins de animais que ingeriram o estigma de milho

apresentaram baixa atividade da CAT com a concentração de 49,11 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg de proteínas, a qual foi aferida através de um espectrofotômetro a 240 nm.

A ação reduzida da glutatona foi elevada nos rins de animais que ingeriram extrato do estigma de milho (187,14 nmol mg de proteína). A peroxidação lipídica foi medida por TBARS (quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e os valores foram expressos como equivalentes de malonildialdeído (MDA); a calibração da curva foi preparada com malonyldialdeído bisdiacetal. A peroxidação lipídica foi reduzida com um valor de 4,20 nmol MDA mg de proteína nos rins. A capacidade de eliminar os radicais livres (RSC) foi determinada usando o DPPH.

### 2.8.2 Atividade antiobesidade do estigma de milho

Os efeitos antiadipogênicos nos extratos do estigma de milho estão intimamente relacionados aos seus metabólitos. Utilizando algumas ferramentas analíticas o estudo com o estigma de milho conseguiu identificar metabólitos que pertencem à classes químicas como por exemplo, flavonoides, polifenóis, derivados fenólicos. Esses metabólitos já foram correlacionados com a atividade antiobesidade. O estudo *in vivo* e *in vitro* com o estigma de milho em células pré-adipócitas 3T3-L1 e camundongos C57BL / 6 identificou uma flavona glicosilada que contribuiu para a inibição da aglomeração lipídica, tratamento com maysin (25, 50, 75 e 100 mg mL), de modo dependente da dose, atenuou o elevado teor de triglicerídeos nos adipócitos por 0,27, 68 e 69%), diferenciação de adipócitos (a concentração de 75 e 100 mg mL reduziu significativamente as expressões de PPAR-g em 37 e 51%, respectivamente), apoptose celular (25, 50, 100 e 200 mg mL por 24h minimizou de forma gradual a viabilidade celular em 80%, 79%, 72%, e 53%, respectivamente, quando comparado com as células do grupo controle (100%). Em uma concentração de 25mg kg a maysina (**20**) junto com uma dieta rica em gordura diminuiu o ganho de peso dos ratos ( $16.19 \pm 0.67$ ), quando comparada com a utilização da dieta gordurosa sem a maysina ( $22,02 \pm 0.50$ ) (LEE et al., 2017).

No estudo de Aguirre et al. (2011), observou-se maior potencial antiobesidade para o extrato etanólico do estigma de milho. As classes químicas encontradas majoritariamente foram: flavonoides e fenólicos, quando comparado ao extrato etanólico do estigma de milho ceroso. A quercetina (**19**) é um flavonóide que apresenta atividade antiobesidade. Pois interrompe o ciclo de vida dos adipócitos diminuindo o peso corporal.

Extratos metanólicos do estigma de milho foram administrados em ratos wistar e os exames bioquímicos apontaram atividade hipolipidêmica com média de colesterol de

79,12±3,77 mg dL para os ratos que consumiram a dieta com uma alta teor de colesterol junto com o estigma de milho na concentração de 400 mg kg, quando comparados com o grupo de ratos que só consumiram a dieta com um alto teor de colesterol o resultado foi de 111,16 ±1,85 mg dL (AHMED; HAMZA; KOTOB, 2016).

Os extratos etanólicos dos estigmas de milho doce (SP e SV) e de cerosos (KJ e KT) no estádio R3 foram analisados. E os extratos SP e SV exibiram como componentes principais, o glicosídeo de quercetina (**63**) e derivados (118,20 ± 2,55 mg 100 g peso seco), ácido ferúlico (**62**) (39,40 ± 0,75 mg 100g peso seco) e derivados da catequina (117,90 ± 10,04 mg equivalentes de catequina/peso seco 100g de fenóis). No KJ e KT, os principais compostos foram, o ácido p-cumárico (26,37 ± 1,06 mg 100 g de peso seco), derivados do ácido gálico (**65**) (93,19 ± 1,91 mg de equivalentes de ácido gálico 100g de peso seco) e derivados de catequina (109,34 ± 5,16 mg equivalentes de catequina 100 g de estigma seco). Estes compostos químicos apresentaram atividade anti-adipogênese e indução de lipólise. (CHAITTIANAN et al., 2016).

### 2.8.3 Atividades antidiabética do estigma de milho

No estudo de Guo et al. (2009), onde a aloxana foi utilizada para induzir diabetes em camundongos e a utilização do extrato de estigma de milho reduziu efetivamente a hiperglicemia aumentando os níveis de insulina e recuperando as células  $\beta$  danificadas. Com a utilização do extrato aquoso de estigma nos respectivos camundongos diabéticos a glicemia ( $p < 0,05$ ) e a hemoglobina glicada ( $p < 0,01$ ) foram atenuadas em camundongos hiperglicêmicos induzidos por aloxana (ambos os indicadores com significância estatística).

Os extratos de acetato de etila e butanólico tiveram efeito anti-hiperglicêmico. Essa conclusão advém da diminuição da  $\alpha$ -amilase ( $IC_{50} = 156,2 \mu\text{g mL}$  e  $64,8 \mu\text{g mL}$ , respectivamente) e  $\alpha$ -glicosidase ( $IC_{50} = 151,2$  e  $170,8 \mu\text{g mL}$ , respectivamente) em ensaios enzimáticos. No modelo de BSA-glicose o extrato de acetato de etila e o extrato butanólico impediram a formação de produtos finais de glicação avançada ( $IC_{50} = 156,8 \mu\text{g mL}$  e  $174,2 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). O ensaio que avaliou a nefropatia utilizou extrato etanólico, acetato de etila, butanólico e aquoso, respectivamente. Estes apresentaram inibição de uma cultura significativa da produção de Col IV, FN e IL-6 em células mesangiais (glicose a  $200 \mu\text{g/mL}$ ) (WANG; ZHAO, 2019).

No estudo de Chen et al. (2013), o polissacarídeo carboximetilado ativou maior capacidade inibidora de  $\alpha$ -amilase diminuindo a digestão de carboidratos. A ordem decrescente

da atividade de inibição foi: polissacarídeo carboximetilado, derivado sulfatado do polissacarídeo, polissacarídeo sem modificação, derivado acetilado do polissacarídeo com os valores de IC<sub>50</sub> de 5,33, 8,54, 10,07 e 10,31 mg mL, respectivamente.

No estudo de Guo et al. (2019) os polissacarídeos do estigma de milho (CSP) com os principais mecanismos moleculares inibiram a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase. A atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase foi proporcionada pelos polissacarídeos, CSP1, CSP2 e CSP3, os respectivos resultados foram expressos em IC<sub>50</sub>: 0,18 mg mL, 0,13 mg mL, 0,17 mg mL e os valores de IC<sub>50</sub> referente a ação dos mesmos polissacarídeos frente à  $\alpha$ -glucosidase, foram: 1,60 mg mL, 1,21 mg mL e 1,79 mg mL, respectivamente. O CSP também regulou a via de sinalização PI3K/Akt e promoveu a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática. Esta translocação amplia a captação de glicose nas células musculares esqueléticas de ratos L6.

O trabalho de Pan et al. (2017), isolou o polissacarídeo (PCS2), este carboidrato composto por d-galactose, D-manose, D - (+) - glicose, D - (+) - xilose, L-arabinose e ramnose. O tratamento com PCS2 atenuou os níveis de glicose no sangue de camundongos tratados com glicose nas respectivas concentrações: 200, 500 e 800 mg kg de PCS2 foram diminuídos em 17,97%, 33,85% e 33,11%, em relação ao do grupo com diabetes controlada. Os resultados mostram que PCS2 tem um efeito antidiabetes.

#### **2.8.4 Atividade anti-inflamatória do estigma de milho**

Wang et al. (2012) testaram a eficácia anti-inflamatória do extrato aquoso do estigma de milho em doses de 2 e 4g kg de peso corporal em ratos com pleurisia induzida por carragenina (Cg). Os resultados mostraram redução no nível de proteína C3 no grupo 4 onde estão inseridos os animais tratados com carragenina e administrados por via oral 4 g, em relação ao grupo controle 13.2 mg dl  $\pm$ 1.7 – p < 0.01), o menor nível de proteína C4 foi observado no grupo 4 (4.0  $\pm$  0.3 mg dL, sem significância estatística em relação ao controle); o menor nível de TNF- $\alpha$  foi observado no grupo 4 em relação ao grupo controle (360.2 $\pm$ 135.7 (pg mL – p < 0.001); o menor nível de IL-1 $\beta$  foi identificado no grupo 4 em relação ao grupo controle (666.0 $\pm$ 49.3 pg mL - p < 0,05); o menor nível de VEGF- $\alpha$  foi encontrado no grupo 4 (540.0 $\pm$ 22.2 pg mL – p < 0.01); o menor nível de IL-17 foi identificado no grupo 4 (73.7 $\pm$ 5.5 pg/mL - p < 0.00). O estigma de milho é promissor para tratar doenças inflamatórias que causam estresse oxidativo.

O estudo de Habtemariam (1998) mostrou uma possível opção para o tratamento de leucócitos regulados pelo TNF. O extrato etanólico atenuou a expressão de ICAM-1 com 50 e

65% de aderência no período de 4 e 18 horas de tratamento e diminuiu a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS (1 e 10 µg/mL) com 18 horas. Mostrando que o extrato etanólico possui atividade anti-inflamatória. No trabalho de Kim et al. (2017), o extrato etanólico do estigma de milho e o extrato etanólico com alto teor de maysina (**20**) na concentração de 10, 50 e 100 µg mL atuaram como promotor anti-inflamatório do LPS induzido por óxido nítrico e TNF- $\alpha$ .

### 2.8.5 Atividades neuroprotetora do estigma de milho

O estudo de Choi et al. (2014) testou o efeito da maysina (**20**), uma flavona glicosilada presente no estigma de milho coreano (Kwangpyeongok), contra o peróxido de hidrogênio. Este metabólito secundário induziu as células do neuroblastoma humano (SK-N-MC) à morte celular. A maysina diminuiu a toxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células SK-N-MC. A avaliação foi realizada por teste de viabilidade celular e liberação de LDH. Este agente também auxilia na formação da dose de ERO intracelular e evita a clivagem do PARP. Esta flavona também diminuiu significativamente danos ao DNA e apoptose celular causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O pré-tratamento com a maysina (**20**) (5-50 µg mL), durante um período de 2 horas aumentou de maneira considerável e dependente da dose os níveis de mRNAs de enzimas antioxidantes: CAT, GPx-1, SOD-1, SOD-2 e HO-µM, com o aumento de 2,49, 2,42, 2,40, 3,15 e 14,75 vezes, respectivamente.

Kan et al. (2012) analisaram extratos etanólicos e extratos em acetato de etila de variedades de milho (*Z. mays* var. *Intendata*, *Z. mays* var. *Indurata*, *Z. mays* var. *Everta* e *Z. mays* var. *Saccharata*) por sua ação inibitória contra acetilcolinesterase (AChE), butiracolinesterase (BChE) e tirosinase em concentrações de: 50, 100 e 200 µg /mL<sup>-1</sup>. A maior inibição da AChE foi realizada pelos extratos em acetato de etila de *Z. mays* var. *Intendata* (96,69 ± 2,06%) e var. *indurata* (92,73% ± 0,98%) à 200 µg mL<sup>-1</sup>. A maior inibição de BChE foi observada no extrato de acetato em etila de *Z. mays* var. *everta*. Apenas os extratos em acetato de etila (44,06%) e etanol (61,54% ± 4,84%) de *Z. mays* var. *saccharata* impediram tirosinase até 100 µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.8.6 Atividades antifadiga do estigma de milho



Hu et al. (2010) avaliaram a atividade antifadiga dos flavonoides do estigma do milho (FCS) após o isolamento destas substâncias. A atividade anti-fadiga da FCS foi investigada através de ratos submetidos a um exercício de natação. O tempo dos grupos clássicos de tratamento não foi superior ao do controle de crescimento ( $p < 0,05$ ). O tempo médio de natação do grupo de ratos que utilizaram inibiu a produção de ácido láctico durante o exercício e o retardo do nitrogênio da uréia no sangue em qualquer exercício em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A dose de glicogênio hepático dos ratos que utilizaram tratamento com flavonoides (taxa crescente de 260,71 e 281,25%) foi mais elevada em relação no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos com o FCS podem aumentar a tolerância ao exercício.

O trabalho de Zhao et al. (2017) testou a atividade antifadiga do polissacarídeo (PCS) composto por ramnose, arabinose, xilose, manose, glicose e galactose. Esse estudo foi desenvolvido com PCS com o objetivo de prolongar significativamente o tempo de treinamento para o exercício em ratos machos foi utilizado polissacarídeos na concentração de 200 e 400 mg/kg. Em fêmeas foram utilizados 400 mg/kg ( $p < 0,05$ ) para minimizar os níveis de nitrogênio da uréia circulante no sangue ( $p < 0,05$ ) e 26,7% ( $p < 0,01$ ). O nível de nitrogênio para as fêmeas foi de 34,5% ( $p < 0,05$ ) e 34,8%, quando utilizada uma concentração de 400 mg/kg, ambos conseguiram uma eliminação do ácido láctico (machos  $p < 0,05$  e fêmeas  $p < 0,01$ ). O aumento de ácido láctico ocorreu conforme as atividades de lactato desidrogenase ( $p < 0,05$ ) e os dados de glicogênio hepático foram encontrados em relação aos machos ( $p < 0,01$ ). O PCS foi testado nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg e obteve um aumento relevante de 66,33% em relação ao grupo controle. A concentração de 400 mg/kg de peso corporal fornece uma dose mais eficiente para a atividade antifadiga em camundongos machos e fêmeas. Corroborando com o estudo anterior esta aplicação teve diminuição da fadiga.

### **2.8.7 Atividades antidiurética do estigma de milho**

O estigma de milho é tradicionalmente utilizado para o tratamento de edema, cistite, gota e litíase renal. O estudo de GRASES et al. (1993) demonstrou que o volume da urina de ratos que ingeriram uma dieta padrão mais o estigma de milho com água por infusão (2 g/L) teve um volume de urina maior ( $23.8 \pm 3.3$ ) em relação aos ratos do grupo controle ( $17.0 \pm 2.3$ ) que consumiram a dieta padrão com água. Vale ressaltar que houve diferença estatística do grupo que utilizou o estigma de milho em relação ao controle.

No estudo de Pinheiro et al. (2011) foi avaliado a atividade do extrato aquoso do estigma de milho, considerando a influência de água no rim, eletrólitos e a pressão arterial em ratos

Wistar anestesiados. Três grupos foram avaliados: o grupo controle recebeu de forma intragástrica de 1mL de água destilada; o segundo grupo recebeu de forma intragástrica 1 mL do extrato do estigma de milho a 20%; o grupo 3 recebeu de forma intragástrica 1 mL de solução com furosemida. O volume de urina na bexiga também foi avaliado com o intuito de calcular o fluxo de água de a cada 30 minutos e quantificar os íons de sódio ( $Q_e$  ( $Na^+$ )). O grupo controle apresentou a menor excreção com 67% ( $p>0,05$ ), no grupo tratado com o extrato de estigma de milho o resultado referente a excreção foi de 127,5% ( $p>0,05$ ), mas a maior excreção de sódio advém do uso da furosemida com excreção de 300% ( $p>0,001$ ).

A excreção de potássio ( $Q_e$  ( $K^+$ )) no grupo controle foi baixa, entretanto o grupo que recebeu extrato do estigma de milho apresentou excreção de 62% ( $p>0,05$ ), contudo, o grupo que recebeu a furosemida apresentou excreção de 155% ( $p>0,05$ ). Em relação ao efeito diurético, o grupo controle não exibiu modificações relevantes (58%,  $p > 0,05$ ) em relação ao período basal, o grupo tratado com o estigma de milho exibiu aumento de 135% ( $p > 0,05$ ) em relação ao período basal e o grupo tratado com a furosemida, este apresentou excreção de 65%,  $p > 0,05$ ) em relação ao período basal. Os resultados exibiram que extrato do estigma de milho tem atividade diurética, entretanto não atua como um diurético de alto potencial, pois não atenuou consideravelmente o potássio e sódio quando comparado com à furosemida.

O estudo de Vranješ et al. (2016) avaliou os efeitos dos extratos do estigma de urtiga, salsa e milho na diurese e composição eletrolítica no rim de camundongo da variedade *Mus musculus* albino NMRI. O maior efeito na quantidade de  $K^+$  foi identificado no estigma de milho. O resultado mais relevante foi observado com 7 dias de utilização do estigma de milho (219,17 mmol L). A quantidade de  $Na^+$  foi maior nos dois primeiros dias (347,98 e 397,01 mmol L, respectivamente).

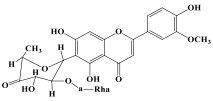
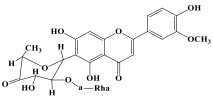
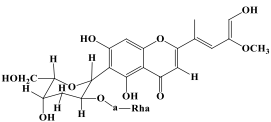
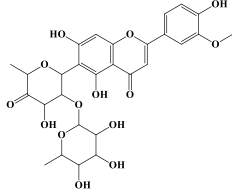
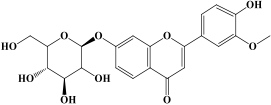
O estudo de Solihah et al. (2015) avaliou o efeito de diurese do estigma de milho utilizando dose dose-resposta no rato Sprague-Dawley. Quantidades de 400, 500, 600, 700 e 800 mg kg. A urina aumentou com os níveis de dosagem de 400-600 mg kg, com variação de 14,06 a 20,13 mL. O teor de  $Na^+$  foi significativamente maior em relação ao controle negativo nas doses de 500, 600, 700 e 800 mg kg ( $62,75 \pm 3,60$ ;  $63,50 \pm 1,79$ ;  $58,67 \pm 3,74$ ;  $62,33 \pm 3,28$ ). Mais uma vez uma atividade diurética relevante do extrato do estigma de milho.

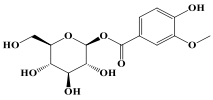
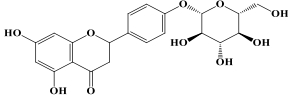
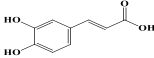
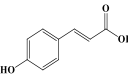
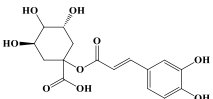
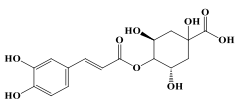
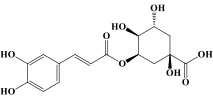
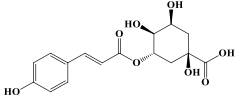
### **2.8.8 Atividades tóxica do estigma de milho**

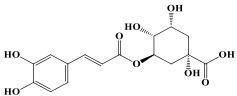
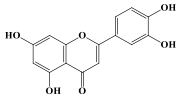
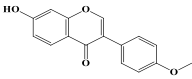
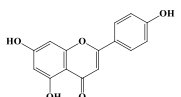
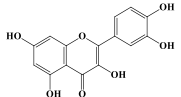
O estigma de milho é amplamente utilizado na medicina chinesa para tratar várias patologias e distúrbios. O estudo de toxicidade realizado por Wang et al. (2011) foi aplicado

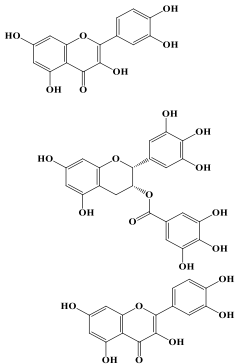
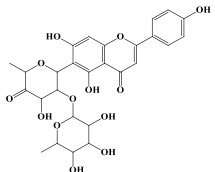
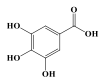
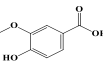
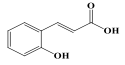
em ratos Wistar machos. Na busca por contaminantes não foi encontrado nenhum valor que ultrapasse a referência limite. Não foi identificado efeitos adversos vinculados ao tratamento com o estigma de milho considerando os parâmetros hematológicos em fêmeas e machos. Este estudo concluiu que o estigma de milho não apresenta efeitos adversos demonstrando segurança no consumo.

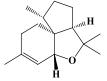
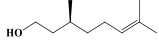

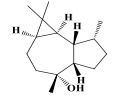
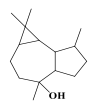
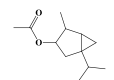

Tabela 1- Compostos, estruturas químicas, atividades farmacológicas descritas em estudos fitoquímicos e farmacológicos do estigma de milho (*Zea mays* L.)

Número	Metabólitos	Estrutura	Atividade	Referência
1	Ax-5 "-metano-3'-metoximisina		Antioxidante	(REN; QIAO; DING, 2013)
2	7,4'-di-hidroxi-3'-metoxiflavona-2 "-O- $\alpha$ -L-ramnosil-6-C-fucosídeo		Antioxidante	(REN; QIAO; DING, 2013)
3	2 "-O- $\alpha$ -L-ramnosil-6-C-3" - desoxiglicosil-3'-metoxiluteolina		Antioxidante	(REN; QIAO; DING, 2013)
4	Ax-4 "- hidroxi-3 -'-metoximisina		Antioxidante	(REN, 2018; BORS et al., 1990; WAISS et al., 1979; PIETTA, 2000; SNOOK, et al., 1993)
5	6, 4'-di-hidroxi-3'-metoxiflavona-7-glucosídeo)		Antioxidante	(REN; QIAO; DING, 2013)










6	Glicose de vaniloil		Antioxidante	(CHAIITIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017)
7	Naringenina 4'-O-glicosídeo		Antiobesidade	CHAIITIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017)
8	Ácido cafeico		Antioxidante e antiobesidade	(ŽILIC et al., 2016; NARITA, et al., 2012)
9	Ácido p-coumarico		Antiadipogênese e antioxidante	(EBRAHIMZADEH; POURMORA; HAFEZI, 2008; CHAIITIANAN et al., 2016)
10	Ácido 1-cafeoilquínico		Antioxidante	(ŽILIC et al., 2016)
11	Ácido 4-O-cafeoilquínico		Antioxidante	(ŽILIC et al., 2016)
12	Ácido 5-O-cafeoilquínico		Antioxidante	(ŽILIC et al., 2016)
13	P-coumaroilquinico		Antioxidante	(ŽILIC et al., 2016)



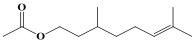
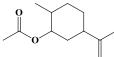

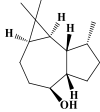
14	Ácido 3-O-cafeoilquínico		Antioxidante	(ŽILIC et al., 2016)
15	Luteolina		Antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, quimiopreventiva, quimioterapêutica, cardioprotetora, antidiabética, neuroprotetora e antialérgica	(YU et al., 2008; BAEK et al., 2017 ; BAEK et al., 2016 ; CHOI et al., 2017 ; LOPEZ-LAZARO, 2009 ; YU et al., 2017 )
16	Formononetina		Antitumoral, anti-inflamatória e anti-dislipidemia	(YU et al., 2008; TIAN et al., 2013; WU et al., 2017)
17	Apigenina		Antiproliferativa, anti-inflamatória, anti-obesidade, antioxidante e anticancer	(YU et al., 2008; VARGO et al., 2006; PAREDES-GONZALEZ et al, 2014)
18	Quercetina		Antiadipogênese, atividade lipolítica, antioxidação, anti-inflamatória, imunomoduladora e anticâncer	(AHN et al., 2008; GONZÁL CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011)

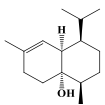
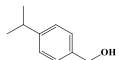
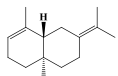
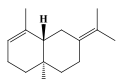



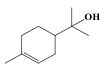

19	Maisina		Anticancerígena, antibiótica, neuroprotetora, imunomoduladora	(WAISS et al., 1979; LEE et al., 2014; CHOI et al, 2014)
20	Apimaisina		Antibiótica	(WAISS et al., 1979; SNOOK, et al., 1993; LEE et al., 1998)
21	Ácido protocatecuico		Antioxidante, anti-hiperglicêmica e neuroprotetora	(EBRAHIMZADEH; POURMORAD; HAFEZI, 2008; MASELLA et al., 2012)
22	Ácido vanílico		Antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora	(EBRAHIMZADE; POURMORAD; HAFEZI, 2008; SINGH et al., 2015)
23	Ácido hidroxicinâmico		Anti-hipersensitiva, anticâncer, diabetes tipo 2 e aterosclerose	(EBRAHIMZADEH; POURMORAD; HAFEZI, 2008; JAISWAL et al., 2011a, JAISWAL et al 2011b, JAISWAL et al 2014a, JAISWAL et al 2014b; NARVAEZ-CUENCA et al., 2012 )






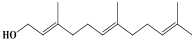
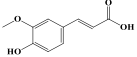
24	6,11-oxidoacor-4-eno		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
25	Citronelol		Antifúngica, antibacteriana, antinociceptiva, anti-piolhos, repelente, anti-alérgica, anti-inflamatória, antiespasmódica, antidiabética, antiolesterol, anti-hiperalgésica, antiansiedade e anticonvulsivante	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; BRITO et al., 2012; KOTAN; KORDALI; CAKIR, 2007; VIOLLON; CHAUMONT, 1994; GONZALEZ-AUDINO, 2011; MICHAELAKIS et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016; ABE et al., 2003; SADRAEI et al., 2013; SRINIVASAN; MURUGANATHAN, 2016, BATUBARA et al., 2015; BRITO et al., 2015; UMEZU et al., 2002; de SOUSA et al., 2006)
26	(E) -3-pinanona		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY, SHIBAMOTO, 2007)
27	Ledol		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
28	Globulol		Sedativa e antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; SILVA et al., 2013; TAN et al., 2008)
29	Novo-iso-3-tujanol		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; SILVA et al., 2013; TAN et al., 2008)
30	Hidrato de cis-sabineno		Antioxidante	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; BERETTA et al., 2011; MEZZA et al., 2018)

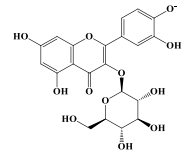
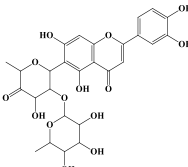
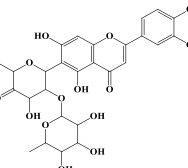
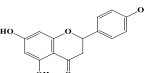
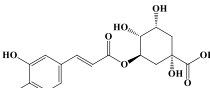



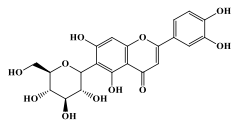
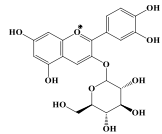
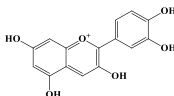
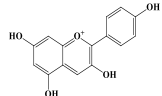
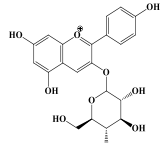
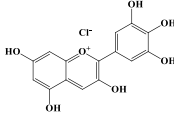
31	Timol		Antioxidante antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; OLMEDO; NEPOTE; GROSSO, 2014; YANG; KHAN; KANG et al., 2015; VALCOURT et al., 2016)
32	(1S, 5R, 6S) -2,7,7-trimetilbiciclo [3.1.1] hept-2-en-6-ol		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; SILVA et al., 2013; TAN et al., 2008)
33	Tujopsadieno		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
34	7-epi-R-selineno		Antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; ALARCÓN et al., 2015)
35	o-cimeno		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
36	Ácido isovalérico		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
37	(E) -hexen-2-al		NT	EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
38	Cubenol		Antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; SOLÍS et al., 2004)
39	Triciclono		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)

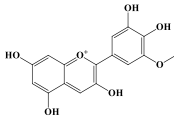
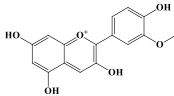
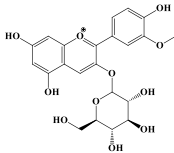
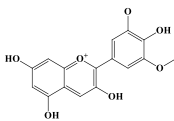
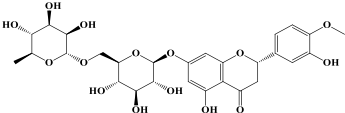
40	alfa-pineno		<p>Antioxidante, inflamatória, antinociceptiva, antibacteriana, antifúngica, antiulcerogênica, anti-<i>leishmania</i>, anticâncer e antiulcerogênica</p>	<p>(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; RATHER et al., 2012; WANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHEN, 2008; KIM et al., 2015; HIM et al., 2008; NISSEN et al., 2010; HONG et al., 2004; PINHEIRO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; CHEN et al., 2015; WANG et al., 2012)</p>
41	Cânfora		<p>Antioxidante e antimicrobiana</p>	<p>(EL-GHORAB, EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; KADRI; ZARAI, 2011; AKARCHARIYA et al., 2017)</p>
42	Acetato de citronelilo		<p>Antihepatoma, pró-apoptótica, fungicida, larvicida, bactericida, repelente / inseticida</p> <p>Antinociceptiva e antitumoral</p>	<p>SHEN; CHEN; DUH, 2012; RAMEZANI, 2006; SINGH; DHIMAN; MITTAL, 2007; MULYANINGSIH et al., 2011; SIRIPORN; MAYURA, 2012, RIOS et al., 2013)</p>
43	Acetato de novoisodihidrocarveol		<p>NT</p>	<p>EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; KADRI; ZARAI, 2011; AKARCHARIYA et al., 2017)</p>
44	Cis-carveol		<p>NT</p>	<p>EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; KADRI; ZARAI, 2011; AKARCHARIYA et al., 2017)</p>
45	Viridiflorol		<p>Antimicrobacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.</p>	<p>(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; TREVIZAN et al., 2016)</p>

46	1-epi-cubenol		Antifúngica	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; SAROJ et al., 2015)
47	P-cimeno-7-ol		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
48	Selina-3,7 (11) -dieno		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
49	Eugenol		Antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagênica e antioxidante	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; JAGANATHAN et al., 2010; ROTH-WALTER et al., 2014; CUSTÓDIO et al., 2010)
50	Verbena		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
51	Sabineno		Antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; BERETTA et al., 2011; VALENTE et al., 2013)
52	(1S, 6R) -3,7,7-trimetilbicyclo [4.1.0] hept-2-eno		Antinociceptiva e anti-inflamatória	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; HUANG et al., 2019)
53	Cis-alfa-terpina		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
54	Transcarveol		Antifúngica	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; ADAM et al., 1998)

55	Carvacrol		Antimicrobiana e antioxidante	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994; OLMEDO; NEPOTE; GROSSO, 2014)
56	(1aR, 4aR, 7R, 7aR, 7bS)-1,1,7-trimetil-4-metilideno-2,3,4a,5,6,7,7a, 7b-octa-hidro-1aH-ciclopropano [e] azuleno		Antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; MULYANINGSIH et al., 2011)
57	Acor-4-eno (6,11-óxido)		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
58	Germacreno (B)		Antimicrobiana	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; KUMAR, TYAGI, 2013)
59	Óxido de beta-himachaleno		NT	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007)
60	Farnesol		Citotóxica, antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antinociceptiva	(EL-GHORAB; EL-MASSRY; SHIBAMOTO, 2007; AU-YEUNG et al., 2008, VERAS et al., 2017, HISAJIMA et al., 2008; LIU et al., 2010; LEE et al., 2015, DE OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013)
61	Ácido ferúlico		Antioxidante	(CHAITTIANAN et al., 2016)

62	Glicosídeo de quercetina		Antioxidante	(CHAI TTIANAN et al., 2016)
63	(-) - Galato de epigallocatequina		Antiproliferação, apoptótica, adipogênese	(CHAI TTIANAN et al., 2016; HUNG et al., 2005; KIM; HIRAISHI; TSUCHIYA; SAKAMOTO, 2010; SAKURAI et al., 2009)
64	Ácido gálico		Antioxidante, antiviral, antibacteriano e antifúngica, anticâncer	(CHAI TTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; FARIED et al., 2007; AYAZ et al., 2005; WANG; PROVAN; HELLIWE, 2003; SINGH. et al., 2016)
65	Naringenina		Anti-inflamatória	(CHAI TTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; JIN et al., 2017)
66	Ácido clorogênico		Antioxidante	HARMON; HARP, 2001; HSU et al., 2006; WILLIAMS et al., 2013)
67	Ácido quínico		Antioxidante e antiobesidade	(PERO; LUND; LEANDERSON, 2009; NARITA, et al., 2012)

68	Isoorientina		Antioxidante	(WIDSTROM; SNOOK, 1998 ; DEEPHA et al., 2014)
69	Cianidina-3-glicosídea		Neuroprotetora, antioxidante e antidiabética	PEDRESCHI.; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; PASCUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002; PEDRESCH; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; CÁSEDAS et al., 2018)
70	Cianidina		NT	(AOKI, KUZE; KATO, 2001; CHAIITTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017)
71	Pelargonidina		Antioxidante	(AOKI, KUZE; KATO, 2001; CHAIITTIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; NODA et al., 2002)
72	Pelargonidina 3-glicosídea		Anti-inflamatória e antioxidante	PEDRESCHI.; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; PASCUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002; ROY; SEM; CHAKRABORTI, 2008)
73	Delfinidina		Atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antiangiogênica e antimutagênica.	(CHAIITTIANAN; SUTTHANUT, RATT; NATHONGKOM, 2017; JEONG et al., 2016; NODA et al., 2002; FAVOT et al., 2003; AZEVEDO et al., 2007)

74	Petunidina		Antioxidante	(CHAIITIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; JIMÉNEZ et al., 2010)
75	Peonidina		Antioxidante	(CHAIITIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; SUN et al., 2018)
76	Peonidina 3-monoglicosídea		Antioxidante	PEDRESCHI.; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; PASCUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002)
77	Malvidina		Inibidora da sinalização oncogênica, anti-hipertensivo, anti- inflamatória, antitumoral e antioxidante	(CHAIITIANAN; SUTTHANUT; RATTANATHONGKOM, 2017; BABA et al., 2017; LEE et al., 2013; HUANG et al., 2014; MARKO et al., 2004; MATSUNAGA et al., 2009)
78	Hesperidina		Analgésica, anti-inflamatória, antioxidantes, anti-hipertensivo, antiviral, anticâncer, moduladora de marcadores inflamatórios e expressão gênica	(EBRAHIMZADEH, POURMORAD, HAFEZI, 2008; COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o metaboloma e atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de extratos do estigma de milho (*Zea mays* L.) de variedade híbrida.

#### **3.2 Objetivos específico**

- Obter os extratos do estigma de *Zea mays* L. *in natura* e de seu produto comercial
- Determinar as atividades antioxidante e teor de fenóis totais dos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos não filamentosos;
- Avaliar os efeitos do tratamento com os extratos na viabilidade de células da linhagem tumoral de glioma de rato (C6);
- Definir o metaboloma dos extratos obtidos a partir das técnicas de cromatografia líquida de alta performance e da gasosa, ambas acopladas a espectrometria de massas;
- Correlacionar as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica com os compostos bioativos identificados nos extratos obtidos.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Obtenção das amostras e preparação dos extratos**

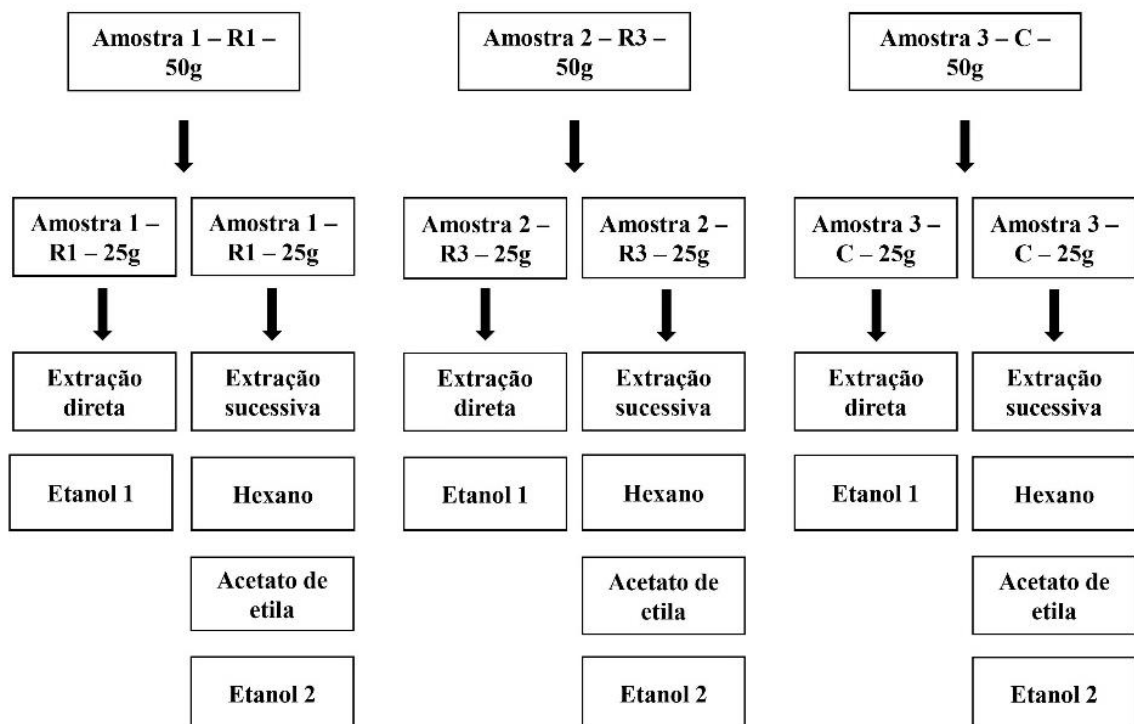
O estigma do milho (*Zea mays* L.) foi obtido através das sementes híbridas AG1051. Esta semente é de ciclo semiprecoce, alto porte, sendo muito utilizado por agricultores familiares por exibir um elevado potencial produtivo. Utilizada para silagem por apresentar grande produção de massa verde com elevada digestibilidade, além de tudo, se destaca no mercado de milho verde e pamonha por causa da sua produção uniforme de maturação e grande aceitação pelos consumidores (SEMENTES AGROCERES, 2012). As amostras foram cultivadas na fazenda experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em 3 de abril de 2018. Com o objetivo de preparar os extratos as primeiras amostras foram coletadas no dia quatro de junho (primeiro estágio reprodutivo) e a última amostra foi coletada no dia vinte e quatro de junho de 2018 (terceiro estágio reprodutivo) no município de Cruz das Almas, que é localizado na região fisiográfica do Recôncavo Baiano apresentando as coordenadas geográficas de 12°40'19 "S,



39°6'23" W e altitude de 220 m. O clima é subúmido e apresenta precipitação de 1.170 mm que pode variar entre 900 e 1.300 mm. Entre março e agosto os meses apresentam mais chuva e entre setembro e fevereiro são mais secos. A temperatura média anual é de 24,1° C e o solo é classificado como Latossolo Grosso de textura argilosa e relevo plano (RIBEIRO et al., 1995).

As amostras foram divididas em três grupos. O primeiro grupo abrange amostras *in natura* coletadas no estágio reprodutivo 1. Este estágio que compreende o período de 7 a 10 dias após a antese, ou seja, 60 a 65 dias após o período de emergência das primeiras folhas da planta chamadas de coleóptilos. O segundo grupo abrange amostras *in natura* coletadas no estágio reprodutivo 3. Este estágio compreende o período de 15 dias após a polinização que acontece no estágio de embonecamento (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). O terceiro grupo compreende amostras comerciais do estigma do milho adquiridas através da compra em loja de produtos naturais em Salvador – BA. Vale salientar que este produto foi dispensado de registro conforme ANVISA- RDC N° 277, DE 22 de setembro de 2005.

**Figura 4** - Modelo de maceração para obtenção dos extratos do estigma de milho (*Zea mays* L.)



Os três grupos de amostras foram secas em temperatura ambiente (25°C) e trituradas até atingir a textura de um pó fino, seguido da utilização de três solventes para extração do ou

dos princípios ativos solventes (hexano, acetato de etila e etanol). Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos. O subgrupo 1 foi submetido à extração direta com etanol e o subgrupo 2 sofreu extrações sucessivas por ordem de polaridade crescente (hexano, acetato de etila, e etanol). A extração foi realizada por 72h por três vezes. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida a 40 °C utilizando um rotaevaporador a vácuo, marca: Fisatom, modelo 801evaporador rotativo (4000 Laborota echo, Alemanha). As amostras permaneceram no exaustor à temperatura ambiente (25 °C) até a completa evaporação de todo o solvente residual e os extratos estarem completamente secos. Foram obtidos quatro extratos de cada amostra, totalizando doze extratos (Figura 4).

**Tabela 2** - Extratos do estigma de milho (*Zea mays* L.) obtidos a partir das amostras e suas respectivas siglas

<b>Amostra</b>	<b>Extrato</b>	<b>Sigla</b>
<b>Estigma de milho <i>in natura</i> – estádio R1</b>	Extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1	E1R1
	Extrato hexânico produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1	HR1
	Extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1	EAR1
	Extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1 que sofreu extrações sucessivas previamente	E2R1
<b>Estigma de milho <i>in natura</i> – estádio R3</b>	Extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3	E1R3
	Extrato com hexano produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3	HR3
	Extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3	EAR3
	Extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 2 sofreu extrações sucessivas previamente	E2R3
<b>Estigma de milho – comercial</b>	Extrato etanólico 1 produzido com a amostra comercial	CE1
	Extrato hexânico produzido com a amostra comercial	CH
	Extrato com acetato de etila produzido com a amostra comercial	CEA
	Extrato etanólico 2 produzido com a amostra comercial que sofreu extrações sucessivas previamente	CE2

Fonte: Própria autoria (2020).

#### 4.2 Ensaio do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio de sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (SANTOS et al., 2018). Inicialmente, 1mL de DPPH ( $120 \text{ mmol L}^{-1}$ ; metanol) foi adicionado a 1mL de cada extrato (foi diluído em metanol) para fornecer 2mL da mistura de reação com a concentração final dos extratos variando de 77 a  $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A absorvância foi aferida a 517 nm após 30 min de reação. Foi utilizado como branco o metanol e a solução de DPPH (1,0mL;  $120 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e etanol (1,0mL) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através do valor da concentração que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) a concentração inicial de DPPH. Para análise estatística foi utilizado um programa computacional de análises estatística chamado SIRVAR. Os resultados foram exibidos através de média e desvio padrão.

#### **4.3 Determinação de fenóis totais**

A determinação do do conteúdo de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (SANTOS et al., 2018). Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  do extrato ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$  em metanol) foram misturados com 50 $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu e 750 $\mu\text{L}$  de água. Posteriormente, 100 $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 15% p / v) foi acrescida à solução atingindo um volume final de 1mL. A mistura reacional foi condicionada no escuro por 120 min. Após esse tempo, a absorvância foi lida a 725 nm (VersaMax <sup>TM</sup> Microplate Reader, EUA). A curva analítica do padrão de ácido gálico foi utilizada para calcular o conteúdo fenólico total nos extratos e os resultados foram expressos em mg EAG g de extrato seco. Foi utilizado como branco uma solução contendo metanol e todos os reagentes, exceto os extratos. Para análise estatística foi utilizado um sistema computacional de análises estatística chamado SIRVAR. Foi avaliada a significância entre as amostras ( $p < 0,05$ ), este teste realiza comparações múltiplas usando bootstrap, utilizando assim o teste Tukey. Os resultados foram proferidos através de média e desvio padrão. Todas as culturas foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello.

#### **4.4 Atividades antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada através da microdiluição sucessiva em placas de 96 poços e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada (SANTOS et al., 2018). Para isto, foram utilizados os microrganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (CCT 0096), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 0090), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Candida albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (CCT 0728). Caldo nutriente (Acumedia, EUA) e extrato de levedura e malte (Acumedia, EUA). Foram utilizados como meios de cultura para o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. Foi utilizado 10 mg de extrato dissolvidos em 975  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido DMSO, 25  $\mu\text{L}$  de Tween e 4 mL de água destilada. As placas foram incubadas a 36 ° C (24 h) e 26 ° C (72 h) para o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. Cloranfenicol (0,19 – 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e garamicina (0,39 – 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Os extratos foram dissolvidos em 20% de DMSO (v/v) ou em Tween a 20% (v/v), os quais fazem parte do controle negativo. Os extratos foram considerados ativos quando inibiram o crescimento microbiano em concentrações abaixo ou igual a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A CIM foi estabelecida pela menor concentração do extrato que limita o crescimento visível do microrganismo utilizado. Dos poços que apresentaram ausência de turbidez, 10  $\mu\text{L}$  do conteúdo foram inoculados em meio de cultivo sólido, como ágar nutriente ou ágar de levedura e malte para avaliar se a atividade foi microbiostática ou microbicida. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

## 4.5 Atividade citotóxica

### 4.5.1 Cultura de células de glioma murino (C6)

As linhagens de glioma murino (C6) foram obtida nos hemisférios cerebrais de ratos Wistar e advém do banco de células do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Estas foram conservadas com 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido à razão de 1,5 – 2,0 x 10<sup>6</sup> células/mL e condicionadas em tubos de criopreservação à -196° (nitrogênio líquido). As linhagens de células C6 derivam de tumores gliais de rato induzidos por N-nitrosometilureia (BENDA et al. 1968). Estas foram cultivadas a uma densidade de 2,5 × 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> (SANTOS et al., 2015). As células foram suspensas em meio Dulbecco (DMEM, Cultilab, SP, Brasil), suplementadas com 100 UI mL penicilina G, 100  $\mu\text{g mL}$  de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0,011 g e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil), semeadas em placas de

cultura em poliestireno (TPP, Suíça) e incubadas numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> à 37 ° C, até atingir 80% de confluência. O meio foi removido e as células foram liberadas para incubação com tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation, Canadá – USA - 0,05%) e 0,002% de ácido etileno diamino (EDTA) e acondicionadas por 2 minutos na incubadora à 37° C. A ação enzimática foi contida com meio de cultura suplementada com soro fetal bovino (10%). Posteriormente as células foram tratadas em tampão fosfato (PBS) com pH 7,4. As células foram centrifugadas à 800 rpm por 5 minutos, ressuspensas em meio DMEM. Estas células foram deslocadas para placa de poliestireno de 96 poços (TPP) numa concentração final de 10.000 células por poço. As células (10 µL) foram transferidas para câmara de Neubauer para contagem.

Após 24h do plaqueamento das células foram tratadas com extrato do estigma de milho na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> (1µL solução estoque\* + 999 µL meio DMEM), este processo é chamado de tratamento. A solução estoque continha 100 mg mL<sup>-1</sup> = 10 mg do extrato + 100 µL de DMSO

O grupo controle foi tratado com DMSO diluído no meio de cultura no volume equivalente máximo utilizado nos grupos tratados (0,1%). As placas foram mantidas por 24 horas à 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes com 8 replicatas por ensaio

#### **4.6 Teste de viabilidade celular**

O teste de viabilidade celular utilizado foi o MTT, (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Esse ensaio colorimétrico tem o objetivo de medir a atividade metabólica de desidrogenases das mitocôndrias em células vivas. Este teste é baseado no princípio da conversão do substrato de cor amarela (MTT) pela clivagem do sal amarelo tetrazólico para cristais de formazan de cor púrpura por células metabolicamente ativas (HANSEN et al., 1989).

Após 24 horas de tratamento das células a viabilidade celular foi medida em placas de cultura pelo método clássico MTT. O reagente de MTT dissolvido em PBS foi adicionado a cada poço (concentração final de 1 mg mL). Após incubação de 2h à 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>, 100 µL/poço de duodecil sulfato de sódio (SDS) à 20% (p/v) em dimetilformamida (DMF à 50% em água, pH 4,7) foi adicionado para lisar células. As células foram mantidas por 12 horas à 37°C. A absorbância foi então medida à 570 nm utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific Varioskan® Flash).

Os experimentos foram repetidos por três vezes e os resultados apresentados com a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle. Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prim 8.0.2, primeiramente foi utilizado um teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e Pearson e teste de Shapiro-Wilk). Os dados foram demonstrados em média, os testes paramétricos feitos nos grupos tratados e controle utilizaram a análise de variância (ANOVA) e o teste de variadas comparações de Bonferroni. Foi utilizado  $p < 0,05$  como referência de significância.

## **4.7 Análises de metabolômica**

### **4.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)**

As análises CG-EM foram realizadas em um sistema de cromatografia composto pelo Cromatógrafo Gasoso CG-2010, detector de massas modelo QP-2010 Plus, aquisição de dados no modo SCAN e Injetor Automático AOC-20i. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida OV-5 (5% de grupos fenila em metil silicone), com 30 m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de fase), ionização por impacto eletrônico com 70 eV, analisador quadrupolo e injetor split/splitless, operando no modo simples. A temperatura do injetor e detector foi mantida à 250°C. A rampa de aquecimento do forno cromatográfico varia de 80° C até 260 °C a uma taxa de 3 °C/min, permanecendo 10 minutos nesta temperatura. Inicialmente, um miligrama de extrato seco foi dissolvido em uma solução com metanol e ribitol (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) para preparar uma solução estoque (1 mg mL<sup>-1</sup>).

Para análises CG-EM, 200  $\mu\text{L}$  da solução estoque foram evaporados usando um concentrador a vácuo (Thermo Scientifici SPD1010, EUA). O próximo passo foi a derivatização utilizando solução com 95  $\mu\text{L}$  de methoxiamina (4 mg mL<sup>-1</sup>) em piridina e as amostras foram condicionadas por 30 min à 60 °C. Posteriormente, foi feita a derivatização por sililação, adicionando 95  $\mu\text{L}$  de N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) mais 1% (v / v) de trimetilclorosilano (TMCS).

### **4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EM).**

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas foram realizadas usando um sistema de cromatografia líquida (Prominence, Shimadzu Co., Japão) acoplado a um espectrômetro de tempo de quadrupolo de massa (microTOF II, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação foi feita em coluna C18, tamanho do poro: 100 Å, 150 mm x 3 mm, tamanho da partícula: 2,6 µm, marca: Kinetex®, número de referência 00F-4462-YC condicionada à 40 °C, acetonitrila e água de grau-HPLC, ambos acidificados com 0,1% (v / v) de ácido fórmico, usado como uma fase móvel. A coluna foi recondicionada com 25% de B por 3min. O fluxo foi de 0,2 mL / min<sup>-1</sup>. A espectrometria de massas foi operada em placa positiva com 3,2 kV na interface ESI e 350 ° C em gás seco. Os espectros de varrimento completo foram adquiridos de 50 a 1000 m / z. Inicialmente, um miligrama de extrato seco foi dissolvido em acetonitrila de grau HPLC (1,0 mL) para preparar uma solução estoque (1 mg mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 500µL da solução-mãe foram diluídos em 500µL de acetonitrila e injetados diretamente no equipamento.

#### **4.7.3 Processamento de dados e identificação de compostos**

##### **Processamento de dados e identificação dos compostos a partir da CG-EM**

Os dados brutos foram processados pelo software ChromaTOF 2.0 (Leco Instruments), seguido pelo alinhamento dos cromatogramas usando o software MetAlign. O MSClust foi utilizado para remover a redundância do sinal do metabólito em tabelas alinhadas de pico de massa e recuperar informações espectrais de massa dos metabólitos usando o agrupamento de pico de massa. Os espectros de massa obtidos foram utilizados para identificação por tentativa de combinação com bibliotecas espectrais (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia [NIST08] e banco de dados do metaboloma Golm [<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>]).

##### **Processamento de dados de CLAE-EM**

Foi utilizado o software de bioinformática XCMS online para processar dados de cromatografia líquida / espectrometria de massas metabolômicos não direcionados. O XCMS online forneceu solução para o fluxo de trabalho metabolômico não direcionado completo, incluindo detecção de recursos, correção do tempo de retenção, alinhamento, identidades supostas de cada metabolito através do banco de dados de metabólitos e classes químicas (METLIN) e visualização de dados.

## Identificação dos compostos por CLAE-EM

A tabela com características moleculares (MF) foi obtida, contendo os tempos de retenção alinhados, a razão  $m/z$  e as intensidades. Os MFs detectados nos espaços em branco foram excluídos das amostras. Para dados de CL-EM a identificação dos metabólitos foi realizada pesquisando  $m/z$  no banco de dados Metlin (<http://metlin.scripps.edu>) usando  $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^{2+}$ ,  $[M + Na]^+$  e  $[M+ACN+H]^+$  como possíveis adutos. A classe de metabólitos foi identificada putativamente usando  $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^{2+}$  e  $[M + Na]^+$  e  $[M+ACN+H]^+$  como possíveis adutos e 5ppm como erro máximo. Para dados de CG-EM os metabólitos foram identificados usando as bibliotecas Fiehn RT e NIST, com base no padrão de fragmentação dos espectros de massa.

### 4.7.4 Normalização de dados da análise univariada e multivariada

O sinal de um cromatograma pode ser dividido em três componentes o sinal analítico, o fundo e o ruído. Logo, se faz necessário o pré-processamento em metabolômica, para isso, são utilizadas algumas técnicas como correção da linha de base, suavização de ruído, alinhamento de pico, distorção, redimensionamento e normalização (PARASTAR; TAULER, 2014).

Os procedimentos de normalização são agrupados em três categorias. A normalização da amostra permite ajustes de uso geral para diferenças entre sua amostra; transformação e escala de dados são duas abordagens diferentes para tornar os recursos individuais mais comparáveis. Pode ser usado individualmente ou combinado para obter melhores resultados.

Neste estudo foi utilizado a normalização por mediana, transformação da raiz cúbica, escalonamento automático (centralizado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável). Essas informações foram utilizadas para gerar o gráfico, que mostra os dados antes e depois da normalização (classes e metabólitos), onde os sinais brutos, sofreram redução do ruído, correção da linha de base, alinhamento e houve a normalização do pico.

Quando se equipara amostras diferentes, a normalização dos perfis cromatográficos é essencial para atingir resultados com diferença quantitativa precisa entre as amostras. As medidas mais utilizadas para normalizações são: média, mediana, desvio padrão total e área total sob a curva.

Os dados normalizados foram carregados no MetaboAnalyst 4.0; um pipeline analítico baseado na Web para alto desempenho de estudos de metabolômica conforme descrito



anteriormente. A normalização foi realizada para permitir o ajuste de propósito geral para diferenças entre amostras, a transformação direta dos dados foi feita através da raiz cúbica e normalização e padronização de escala de intensidade (auto-scaling). A análise multivariada foi realizada usando a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLSDA), análise de cluster a partir de agrupamento hierárquico (METABONALYST, 2011).

#### **4.7.5 Análise univariada**

A análise univariada foi realizada através da plataforma on-line, Metabonalyt 4.0. Dentro do conjunto de ferramentas disponível por esta plataforma. Foi utilizada o teste paramétrico de análise variância unidirecional (ANOVA one-way, do inglês Analysis Of Variance). A taxa de falsas descobertas (FDR, do inglês False Discovery Rate) foi empregada para apresentar a proporção esperada de hipóteses nulas rejeitadas de forma errônea utilizando como parâmetro de significância os metabólitos com valor de  $p < 0,05$ , afim de controlar falsos valores positivos (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Também foi utilizado o pós-teste de Turkey. Este teste busca comparações múltiplas de médias, de dois em dois grupos, com alta precisão com o intuito de determinar a diferença mínima significativa (HSD, do inglês Honest Significant Difference) na análise de variância (HOFFMAN, 2019).

A plotagem de volcano também foi realizada através da plataforma on-line, Metabonalyt 4.0. Na análise não emparelhada, o eixo X é a mudança de dobra ( $\log$  (FC) e este parâmetro demonstra o número de contagens significativas com o limite de decisão de 1,5. O eixo Y é  $-\log^{10}$  (valor de p) é baseado em valores brutos, usando como parâmetro de significância o valor de  $p < 0,05$  (BOCCARD; RUDAZ, 2020)

#### **4.7.6 Análise multivariada**

Visando à detecção de um padrão espectral para cada extrato foi utilizada a análise parcial discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA), que consede o alcance dos metabólitos estatisticamente significativos nas amostras avaliadas, tanto aqueles que sejam comuns aos diferentes grupos quanto os compostos que sejam exclusivos de um único grupo (ALLEN; WILLIAMS; SIGMAN, 2019).

Esta é uma das técnicas de análise de dados multivariadas amplamente aplicadas para quimiometria, pois demonstra a visualização gráfica de variados padrões de dados e relações

com base em pontuações e carregamentos para os componentes correspondentes. PLS-DA encontra a separação máxima entre metabólitos e classe com mais eficiência e base na designação de membro da classe, o que permite encontrar padrões nos dados (WORLEY; POWERS, 2012; TORAMAN et al., 2016). O gráfico de pontuação PLS-DA foi feito, minimizando o arcabouço multidimensional dos dados e oferecendo um mapa bidimensional para avaliar a variação entre as amostras levando em consideração seus metabólitos secundários.

O PLS-DA projeta os dados (x) em um espaço de baixa dimensão que intensifica a cisão entre os dissemelhantes grupos de dados nas primeiras dimensões (variáveis latentes). Essas variáveis são classificadas a partir do quão bem elas explicam a variância (y). Para exibir estes dados foi utilizado um gráfico de pontuação em duas dimensões (PEREIRA et al., 2018).

Nesse estudo foi comparado a diferença sempre entre os 12 extratos obtendo 2 gráficos de PLS-DA com uma variância entre o metaboloma das amostras R1, R3 e comerciais. Com o objetivo de avaliar diferenças intra-grupos em relação a variação entre a dispersão da concentração de seus metabólitos. A importância da variável na projeção é a soma ponderada dos quadrados dos pesos da PLS considerando o grau de variância explicada da variável dependente em cada componente. A importância variável na projeção (VIP) foi o método utilizado como ferramenta de seleção de variáveis acoplado PLS-DA.

Foram considerados potenciais biomarcadores as variáveis localizadas longe do agrupamento central da maioria das variáveis no gráfico de pontuação bidimensional de PLS-DA e resultados fornecidos pelo índice de importância da variável na projeção (IVP) (LU et al., 2014).

A importância da variável na projeção caracterizou o modelo PLS-DA. Os vetores informativos demonstram a sua importância no modelo de regressão original. Existem duas medidas de importância no PLS-DA: uma é de importância variável na projeção (VIP) e a outra é a soma ponderada dos coeficientes de regressão absolutos (coef.).

O modelo de classificação estabelecido para o conjunto de dados foi avaliado utilizando validação cruzada. Foi utilizado método da validação cruzada. Este método considerou a quantidade de amostras disponíveis para utilizar tanto para o conjunto de treinamento quanto para o conjunto de validação. Para os dados desta pesquisa foi utilizado o método LOOCV (do inglês Leave One Out CrossValidation), no qual consiste em escolher uma das amostras para compor o conjunto de validação e as demais amostras remanescentes são usadas para o conjunto de treinamento. Posteriormente uma nova amostra é retirada para integrar o conjunto de treinamento (SZYMAŃSKA et al., 2012).

A capacidade de predição do modelo foi avaliada utilizando os parâmetros de exatidão  $R^2$  e  $Q^2$  para o componente 2. O  $Q^2$  mensura a qualidade da predição do modelo ou acurácia do modelo ajustado. A avaliação considerou valores maiores que zero. O  $F^2$  é avaliado pela razão entre a parte explicada pelo modelo e a parte não explicada ( $F^2 = R^2 / (1 - R^2)$ ).

O  $Q^2$  é uma estimativa da capacidade preditiva do modelo e é calculada via validação cruzada (VC). Em cada VC os dados previstos são comparados com os dados originais e a soma dos erros ao quadrado é calculada. O erro de previsão é então somado em todas as amostras (soma residual prevista dos quadrados ou PRESS). Por conveniência, o PRESS é dividido pela soma inicial dos quadrados e subtraído de 1 para se parecer com a escala do  $R^2$ . Boas previsões terão PRESS baixo ou  $Q^2$  alto.

Neste estudo foi utilizado como medida de importância: VIP. O cálculo do valor de VIP escores de uma variável J, considera que o “d” é o número de variáveis do conjunto X, h é o número de variáveis latentes do modelo, w é o vetor fator-peso, entre o vetor-coluna de XJ e o vetor y, e  $v_k$  descreve a variância de X calculada a começar dos escores e dos resultados das previsões y. Esse vetor é super relevante para a explicação dos modelos e é capaz de ser utilizado na escolha de variáveis. A média dos quadrados dos valores de VIP escores de todas as variáveis é igual a um.

Neste estudo também foi utilizado a técnica estatística por análise de agrupamento. Com o objetivo de classificar um conjunto de metabólitos em grupos distintos chamados clusters. O cluster hierárquico é uma técnica para reordenar matrizes, mostrando que existem  $2^n - 1$  arranjos possíveis para “n” linhas ou colunas relacionadas por uma árvore de cluster.

O mapa de calor estático foi modelo escolhido para apresentar os resultados, considerando que as linhas e as colunas formam grupos e criam blocos de células de cores semelhantes que são fáceis de detectar, foi utilizado a métrica de distância euclidiana; foi usado algoritmo de agrupamento, ward, este método avalia medida de distância entre dois agrupamentos é a soma das distâncias ao quadrado entre os dois agrupamentos; foi inserido o contraste de cor padrão, todos os dados foram normalizados e foi incluído o recurso de escala automática. Para estes dados foi aplicado o teste T/ ANOVA. O mapa de calor foi gerado através do pacote estatístico MetaboAnalyst 3.0.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Atividade antioxidante**

Neste estudo foi utilizado o ensaio de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) devido a sua boa estabilidade na inexistência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (DENG; CHENG; YANG, 2011; SCHERER; GODOY, 2009). Este método é aplicado em mais de 90% das pesquisas que avaliam a atividade antioxidante de extratos complexos. Este estudo utiliza a redução do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), levando em consideração a quantidade necessária de antioxidante para reduzir o DPPH em 50% ( $IC_{50}$ ) (BITTENCOURT et al., 2015; SZABO et al., 2007; KANDI; CHARLES, 2019).

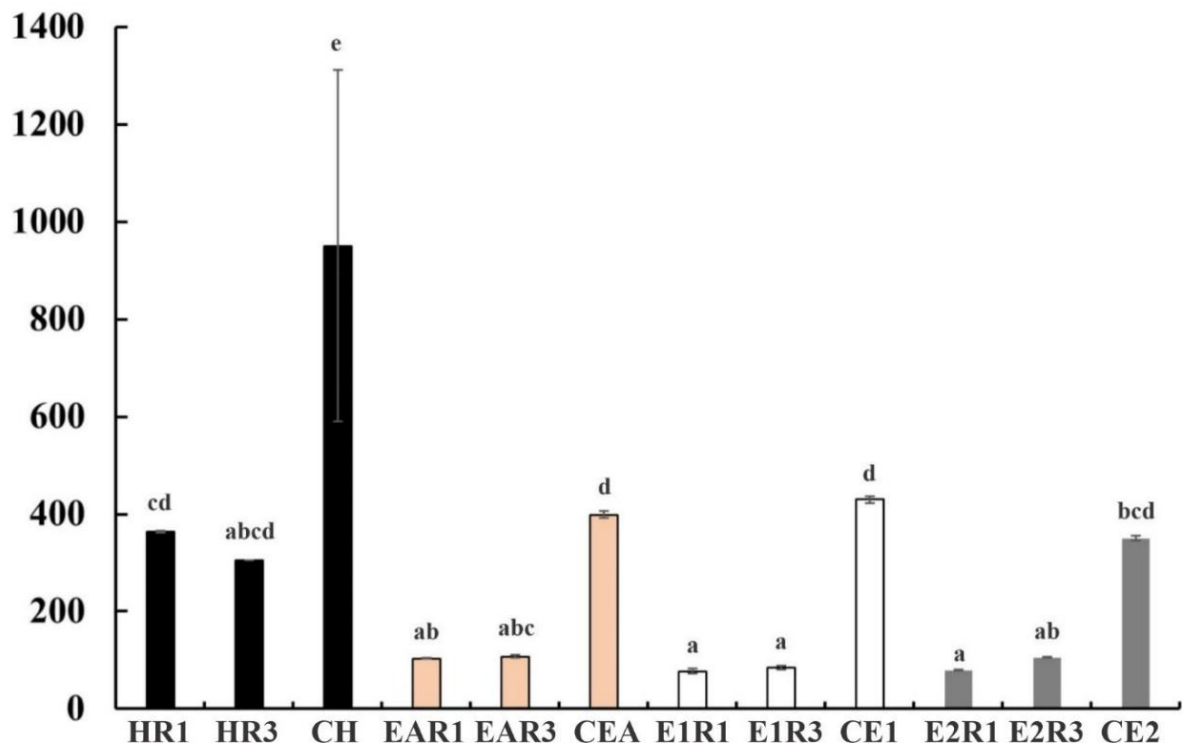
O extrato hexânico HR1 apresentou  $IC_{50}$  de  $364,16 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 1,52$  (cd), enquanto que o HR3 apresentou  $IC_{50}$  de  $305,41 \pm 0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$  (abcd). O extrato CH apresentou  $IC_{50}$  de  $950,32 \pm 1,22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (e) (Figura 5). Ambos os extratos apresetaram diferença estatística entre si.

O extrato EAR1 apresentou  $IC_{50}$  de  $103,24 \pm 0,93 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ab), enquanto que o EAR3 apresentou o valor  $IC_{50}$  de  $107,01 \pm 2,66 \mu\text{g mL}^{-1}$  (abc) e o extrato comercial CEA apresentou  $IC_{50}$  de  $398,56 \pm 6,49 \mu\text{g mL}^{-1}$  (d). Ambos os extratos apresetaram diferença estatística entre si.

O extrato E1R1 apresentou  $IC_{50}$  de  $77,44 \pm 3,95 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a), enquanto que o E1R3 foi de  $84,43 \pm 3,77 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a), os dois extratos não apresetaram diferença estatística entre si, o CE1 apresentou  $IC_{50}$  de  $429,62 \pm 6,61 \mu\text{g mL}^{-1}$  (d), o qual apresentou diferença estatística quando comparado com o E1R1 e E1R3.

O extrato de E2R1 e E2R3 apresentaram valores de  $IC_{50}$  de  $79,18 \pm 0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a) e  $105,78 \pm 0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (ab). Adicionalmente, o do extrato CE2 foi de  $349,73 \pm 4,34 \mu\text{g mL}^{-1}$  (bcd) (Figura 5). Ambos os extratos apresetaram diferença estatística entre si.

**Figura 5** - Atividade antioxidante de extratos do estigma de *Zea mays* L. *in natura* R1 e R3 e o comercial (IC<sub>50</sub>)



As barras em preto correspondem aos extratos em hexano, barras em laranja corresponde aos extratos em acetato de etila, barras em branco correspondem aos extratos etanólicos 1 e barras em cinza correspondem aos extratos etanólicos 2. H = hexano; C = comercial; EA = acetato de etila; E = extrato etanólico que advém de uma extração direta, R1 = estágio reprodutivo 1, R3 = estágio reprodutivo 3. IC<sub>50</sub> do ácido gálico (controle positivo) =  $1,69 \pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Letras diferentes mostram diferença significativa entre as amostras utilizando o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Quantificação de fenóis totais

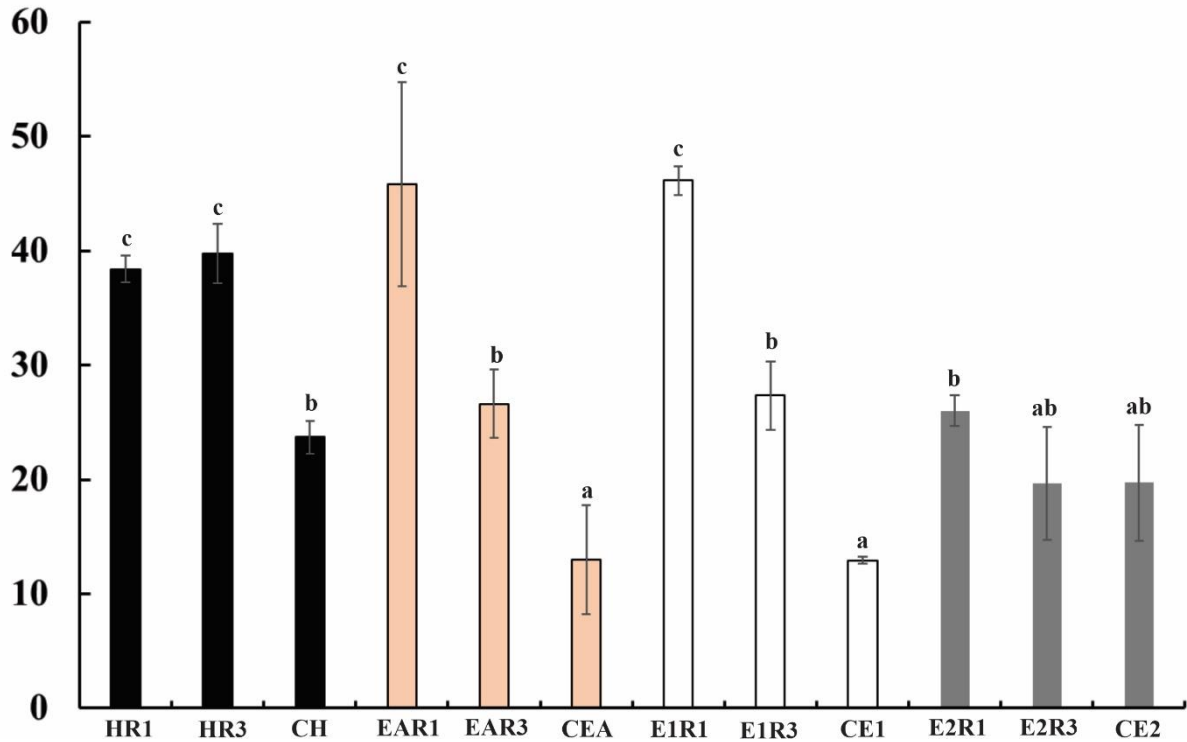
Os fenóis totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (SANTOS et al, 2018). No extrato HR1 a quantidade de fenóis totais foi de  $38,39 \pm 1,00 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (c), no HR3 foi de  $39,74 \pm 2,25 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (c), os dois extratos não apresentaram diferença estatística entre si, o CH foi de  $23,69 \pm 1,22 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (b), o qual apresentou diferença estatística quando comparado com o HR1 e HR3 (Figura 6).

Nos extratos a quantidade de fenóis totais foi de  $45,84 \pm 7,71 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (c) para EAR1, de  $26,61 \pm 2,57 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (b) para EAR3 e de  $12,96 \pm 4,11 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (a) para CEA. Ambos os extratos apresentaram diferença estatística entre si.

No extrato E1R1 a quantidade de fenólicos totais foi de  $46,14 \pm 1,08 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (c), no extrato E1R3 foi de  $27,34 \pm 2,57 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (b) e no extrato CE1 foi de  $12,92 \pm 0,26 \text{ mg EAG g}^{-1}$  (a). Ambos os extratos apresentaram diferença estatística entre si. No extrato E2R1 a

quantidade de fenóis totais foi de  $26,01 \pm 2,16$  mg EAG  $g^{-1}$  (b), no extrato E2R3 foi de  $19,63 \pm 4,28$  mg EAG  $g^{-1}$  (ab) e no extrato CE2 foi de  $19,70 \pm 4,41$  mg EAG  $g^{-1}$  (ab). Os extratos E2R3 e CE2 apresentaram significância estatística quando comparados com o extrato E2R1.

**Figura 6** - Teor total dos compostos fenólicos de extratos do estigma de *Zea mays* L. *in natura* R1 e R3 e o comercial (mg EAG  $g^{-1}$ )



As barras em preto correspondem aos extratos em hexano, barras em laranja corresponde aos extratos em acetato de etila, barras em branco correspondem aos extratos etanólicos 1 e barras em cinza correspondem aos extratos etanólicos 2. H = hexano; C = comercial; EA = acetato de etila; E = extrato etanólico que advém de uma extração direta, R1 = estágio reprodutivo 1, R3 = estágio reprodutivo 3.  $IC_{50}$  do ácido gálico (controle positivo) =  $1,69 \pm 0,02$   $\mu g \cdot mL^{-1}$ . Letras diferentes mostram diferença significativa entre as amostras utilizando o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Atividade antimicrobiana

Neste estudo, extratos com CIM superior a  $500 \mu g \cdot mL^{-1}$  foram classificados como não ativos (n.a). Dos doze extratos avaliados, três apresentaram atividade antimicrobiana. O EAR1 apresentou atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* ( $500 \mu g \cdot mL^{-1}$ ) e os E1R1 e E2R3 foram bacteriostáticos para *B. subtilis* ( $500 \mu g \cdot mL^{-1}$ ) (Tabela 3). Nenhum dos extratos atividade microbicida após o cultivo em ágar nutriente.

**Tabela 3** - Atividade antibacteriana dos extratos do estigma de *Zea mays* L. contra bactérias

Extratos	Bactéria gram-positiva ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )	Bactéria gram-negativa ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )
----------	---	---

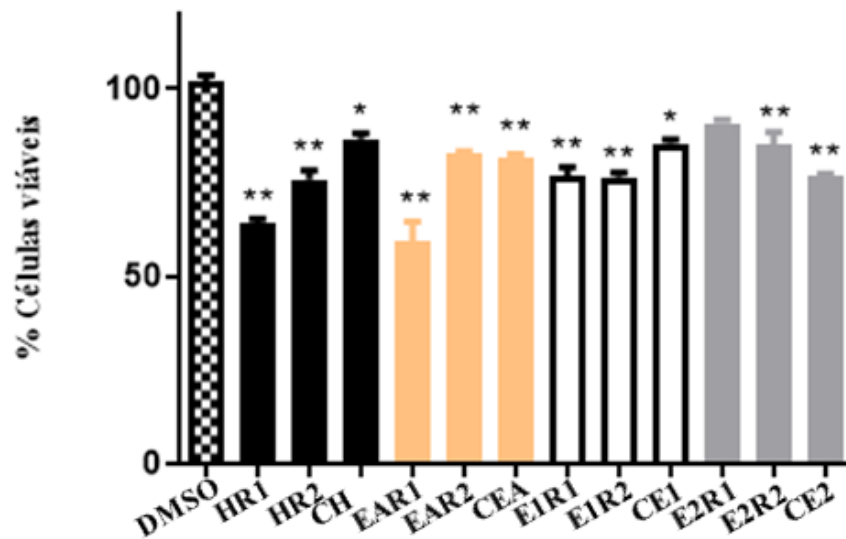
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E1R1	500	n.a
E2R3	500	n.a
EAR1	500	500
<i>Cloranfenicol</i>	3,12	3,12

n.a= não ativo. Os resultados estão representados em concentração inibitória mínima (CIM).

#### 5.4 Atividade citotóxica

Neste estudo foi realizado uma análise dose-resposta para testar a toxicidade de extratos dos estigmas de milho, com concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , frente à linhagem de glioma murino (C6). Segue os valores referente à inibição da viabilidade celular após o tratamento com os respectivos extratos: EAR1(40,74%), HR1 (36%), HR3 (24,18%), E1R3 (23,69%), E1R1 (23,43%), CE2 (23,15%), CEA (18,28%), EAR3 (17,23%), E2R3 (15,07%), CE1(14,57%), CH (13,33%), E2R1(9,26%) (Figura 7).

Figura 7 - Viabilidade da linhagem de glioma murino (C6)



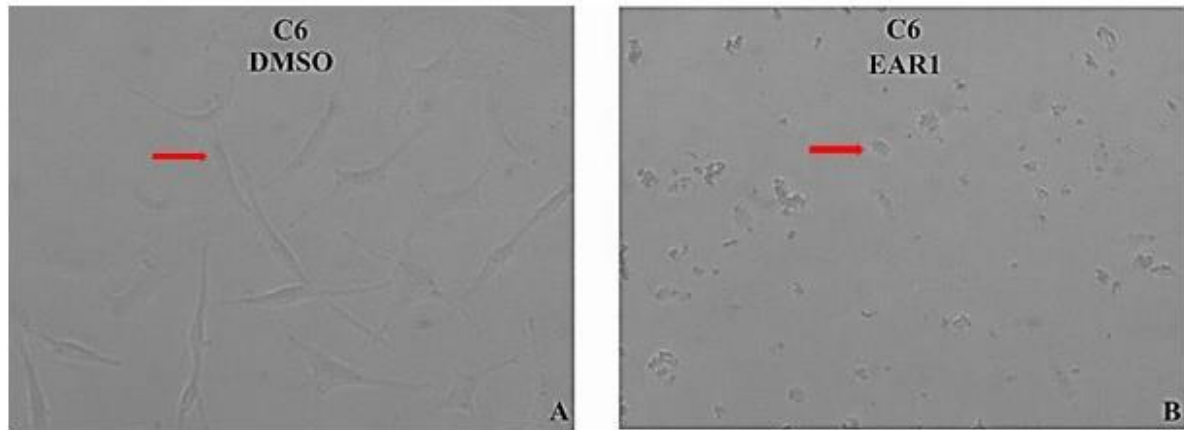
Avaliação realizada pelo teste do MTT após 24h de exposição aos extratos do estigma de *Zea mays* L. ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os resultados foram expostos em triplicatas por \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ , comparando ao grupo controle DMSO.

##### 5.4.1 Avaliação da morfologia celular e celularidade

A microscopia de contraste de fase possibilitou a análise da citotoxicidade nas células C6 sobre o tratamento do extrato EAR1 do estigma de *Zea mays* L.. No controle foi possível observar uma monocamada celular homogênea e confluenta (Figura 8A). O tratamento com o extrato EAR1 influenciou para diminuição das células viáveis, apresentando atenuação do

tapete celular e alterações na morfologia celular de fusiformes para arredondadas e *debris* celulares (Figura 8B).

**Figura 8** Microscopia de contraste de fase da morfologia de células C6



A= Células não tratadas (DMSO  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). B= Células tratadas com o extrato mais tóxico do estigma (EAR1) de *Zea mays* L. ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) após um período de 24 horas. É possível observar que após o tratamento houve redução da celularidade, perda do tapete celular e mudança na morfologia celular de fusiformes para arredondadas, indicada pela seta branca e presença de *debris* celulares indicados setas pretas

### 5.5 Caracterização do perfil metabolômico

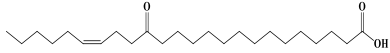
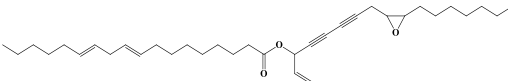
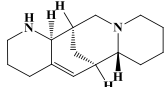
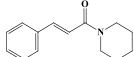
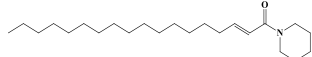
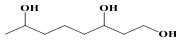
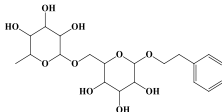
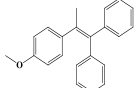
Foram inferidas a identificação de dezoito metabólitos nos extratos do estigma de *Zea mays* L. através da análise de CLAE-EM. Foram identificados dois ácidos graxos e derivados, três alcaloides e derivados, um álcool graxo, um carboidrato e derivados, um estilbenoide, um glicosídeo esteroidal, uma lignana, duas saponinas, três terpenoides e derivados. A identificação dos metabólitos foi realizada comparando-se a razão massa-carga de alta resolução com o banco de dados Metlin. Foi utilizado os adutos  $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^{2+}$  e  $[M + Na]^+$   $[M+ACN+H]^+$  O tempo de retenção alinhado (RT), bem como as fórmulas moleculares e a estrutura química de cada metabólito foram apresentadas na Tabela 4).

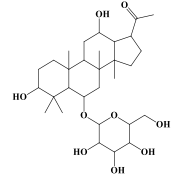
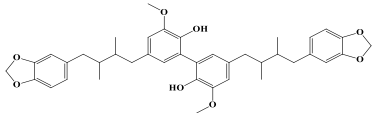
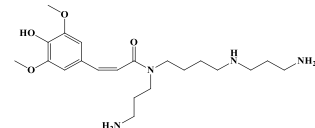
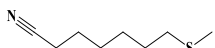
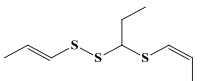
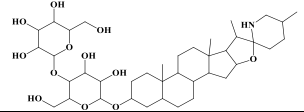
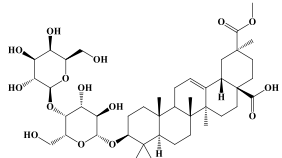
Estes resultados são animadores, visto que algumas classes químicas que abrangem os metabólitos identificados neste estudo apresentam atividades biológicas benéficas à saúde humana. Os ácidos graxos apresentaram atividade citotóxica frente a várias linhagens tumorais (JÓŹWIAK et al., 2020), os glicosídeos frente às células de leucemia HL-60 e MOLT-4 (SASHIDA,1999) e as lignanas contra a linhagem celular BxPC-3 (YANG et al., 2017). Os triterpenoides também exibiram atividade citotóxica contra as linhagens celulares Hep3B e HepG2 (BAI et al., 2020). As saponinas apresentam atividade antibactericida contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. cereus* (DONG et al., 2020) e os terpenoides também apresentam ação

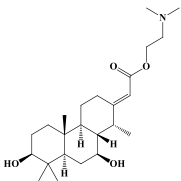
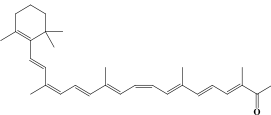
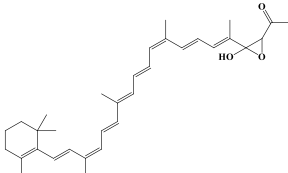


antimicobacteriana contra as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (PASSOS et al., 2019).

Tabela 4 - Metabólitos identificados nos extratos do estigma de *Zea mays* L. por CLAE-EM

CLASSE	TR	NOME	FÓRMULA	MASSA	ADUTO	ESTRUTURA
Ácido graxo e derivados	18.8958	Ácido 15-oxo-18Z-tetracosênico	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	380.3290	[M+H] <sup>+</sup>	
Ácido graxo e derivados	24.5410	Linoleato de Panaxydol	C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>3</sub>	522.4073	[M+ACN+H] <sup>+</sup>	
Alcaloide e derivados	0.1026	Aloperina	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub>	232.1939	[M+Na] <sup>+</sup>	
Alcaloide e derivados	16.5161	1-Cinnamoylpiperidina	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO	215.1310	[M+Na]	
Alcaloide e derivados	21.7988	Pipercitina	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO	34.3345	[M+Na] <sup>+</sup>	
Álcool graxo	6.0903	(3R,7R)-1,3,7-Octanetriol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	162.1256	[M+Na] <sup>+</sup>	
Carboidrato e derivados	0.0858	Fenetil rutinosídeo	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	430.1839	[M+Na] <sup>+</sup>	
Estilbenoide	1.3188	1-difenil-2-(4-metoxifenil)propeno	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	300.1514	[M+2H] <sup>2+</sup>	

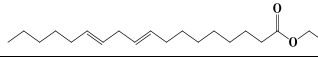
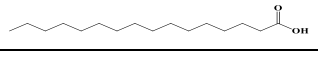
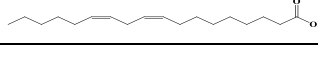
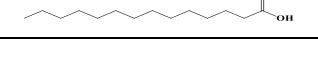

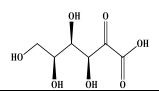

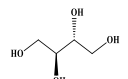
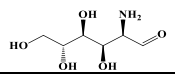
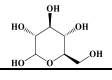
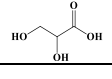

<b>Glicosídeo esteroidal</b>	11.7118	Notoginsenosídeo R10	$C_{30}H_{50}O_9$	554.3455	$[M+2H]^{2+}$	
<b>Lignan</b>	0.0858	Argenteane	$C_{40}H_{46}O_8$	654.3193	$[M+ACN+H]^+$	
<b>Outros</b>	18.7675	Sinapoylspermina	$C_{21}H_{36}N_4O_4$	408.2737	$[M+ACN+H]^+$	
<b>Outros</b>	0.1026	7-(Methylthio)heptanenitrile	$C_8H_{15}NS$	157.0925	$[M+ACN+H]^+$	
<b>Outros</b>	3.8987	1-Propenyl 1-(1-propenylthio)dissulfeto propyl	$C_9H_{16}S_3$	220.0414	$[M+Na]^+$	
<b>Saponinas</b>	20.4606	Lycoperside D	$C_{39}H_{65}NO_{12}$	739.4507	$[M+2H]^{2+}$	
<b>Saponinas</b>	13.9135	Yiamolosite B	$C_{43}H_{68}O_{15}$	824.4558	$[M+Na]^+$	

<b>Terpenoides e derivados</b>	20.5494	Cassaidine	$C_{24}H_{41}NO_4$	407.3036	$[M+ACN+H]^+$	
<b>Triterpenoides e derivados</b>	20344	Sintaxanthin	$C_{31}H_{42}O$	430.3236	$[M+ACN+H]^+$	
<b>Triterpenoides e derivados</b>	16.0818	7',8'-Dihydro-8'-hydroxycitranixanthin	$C_{33}H_{44}O_3$	488.3290	$[M+2H]^{2+}$	

Fonte: Própria Autoria (2020).

Foram identificados doze metabólitos nos extratos do estigma de *Zea mays* L., através da análise de CG-EM, sendo quatro ácidos graxos e derivados, três ácidos orgânicos, cinco carboidratos e derivados. A identificação dos metabólitos foi realizada utilizando os espectros de massas para identificação por tentativa de combinação com bibliotecas espectrais. O tempo de retenção alinhado (RT), bem como as fórmulas moleculares e a estrutura química de cada metabólito foram apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Metabólitos identificados nos extratos do estigma de *Zea mays* L. por CG-EM

CLASSE	RT	NOME	FÓRMULA	MASSA	ESTRUTURA
Ácidos graxos e derivados	19.5516	Ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico	$C_{20}H_{36}O_2$	308.2715	
Ácidos graxos e derivados	23.0433	Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	256.2402	
Ácidos graxos e derivados	19.9766	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	280.2402	
Ácidos graxos e derivados	18.4599	Ácido tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$	228.2089	
Ácidos orgânicos	7.5766	Ácido pirúvico	$C_3H_4O_3$	88.0160	
Ácidos orgânicos	17.9183	Ácido 2-ceto-L-glucônico	$C_6H_{10}O_7$	194.0426	
Ácidos orgânicos	10.2016	Ácido láctico	$C_3H_6O_3$	90.0316	
Carboidratos e derivados	15.6766	Eritritol	$C_6H_{10}O_7$	194.0426	
Carboidratos e derivados	17.4266	Glucosamina	$C_6H_{13}NO_5$	179.0793	
Carboidratos e derivados	20.6350	Glicose	$C_6H_{12}O_6$	180.0633	
Carboidratos e derivados	6.3099	Ácido glicérico	$C_3H_6O_4$	106.0266	
Carboidratos e derivados	15.8350	Ramnose	$C_6H_{12}O_5$	164.0684	

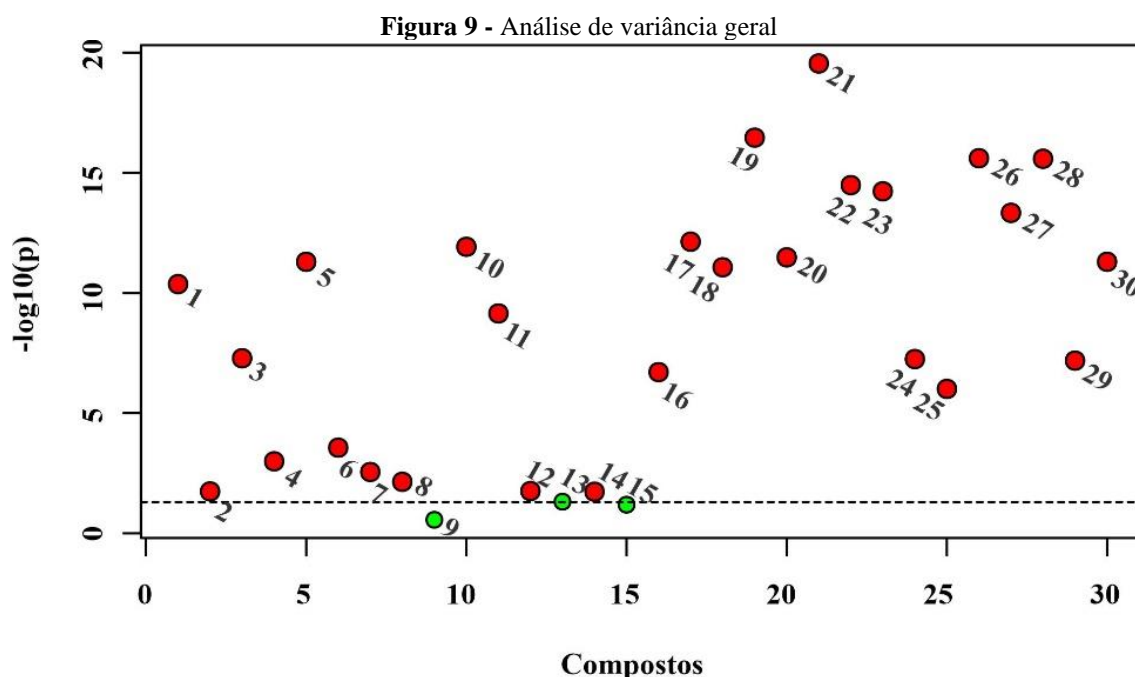
Fonte: Própria Autoria (2020).

## 5.6 Análises univariada e multivariada

### 5.6.1 Análise de variância (ANOVA) geral

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando constatada significância as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ajustado pelo FDR, do inglês False Discovery Rate  $\leq 0,05$  (Figura 9).

Vinte e sete compostos tiveram variação significativa considerando fatores como: solventes distintos (hexano, acetato de etila e etanol), estádios fenológicos (R1 e R3) e natureza das amostras (*in natura* e comercial) para a análise pós-teste de Tukey. Entretanto, estes metabólitos são significativos numa grande quantidade de comparações. Destes compostos significativos há seis carboidratos e derivados (**12, 21, 22, 23, 24, 29**), cinco ácidos graxos e derivados (**11, 20, 25, 27 30**), três metabólitos considerados como “outros” (**3, 4, 14**), três ácidos orgânicos (**19, 26, 28**), um álcool graxo (**1**), um triterpenoide e derivados (**5**), um alcaloide e derivados (**6**), um terpenoide e derivados (**8**), um glicosídeo esteróidal (**10**), uma saponina (**16**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**),



**1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosenóico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **5** = 7', 8'-di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **6** = aloperina, **7** = argenteane, **8** = cassaidina, **9** = licoperósido D, **10** = notoginsenosídeo R10, **11** = linoleato de panaxidol, **12** = rutinosídeo de fenetil, **13** = piperitina, **14** = sinapaldeído espermina, **15** = syntaxantina, **16** = yiamolósido B, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, **21** = eritritol, **22** = glucosamina, **23** = glicose, **24** = ácido glicérico, **25** = ácido hexadecanóico, **26** = ácido láctico, **27** = ácido linoleico **28** = ácido pirúvico, **29** = ramnose, **30** = ácido tetradecanóico.

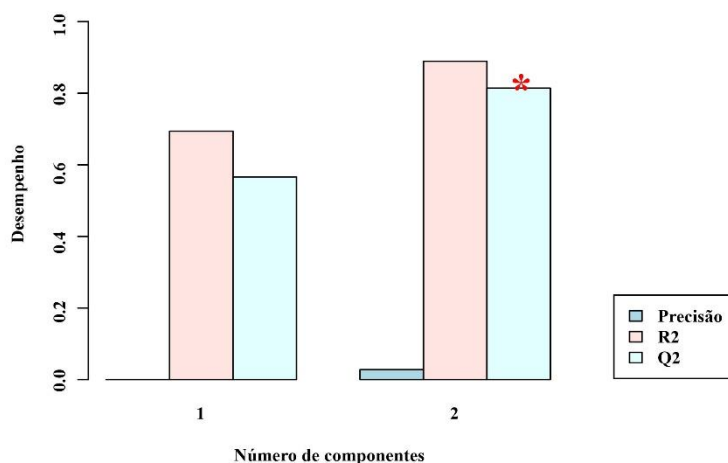
A bolas vermelhas representam os metabólitos com significância estatística e as bolas verdes representam metabólitos sem significância estatística.

### 5.6.2 Análise parcial discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA) geral

A robustez do modelo criado pela análise de PLS-DA foi avaliada através da validação cruzada utilizando os parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$ . A validação cruzada apresentou  $R^2 = 88,93\%$  e  $Q^2 = 81,41\%$  (dois componentes) (Figura 10). O coeficiente de Pearson ( $R^2$ ), classifica  $R^2 = 2\%$ , como baixo efeito,  $R^2 = 13\%$ , efeito médio,  $R^2 = 26\%$  efeito relevante (COHEN, 1988). Para critério de avaliação de  $Q^2$  devem ser obtidos valores maiores que zero (HAIR et al., 2014).

Deste modo, o PLS-DA é um ótimo modelo para a discriminação das amostras, considerando fatores como: solventes distintos (hexano, acetato de etila e etanol), estádios fenológicos R1 e R3 e natureza das amostras (*in natura* e comercial).

**Figura 10** - Validação cruzada do PLS-DA geral



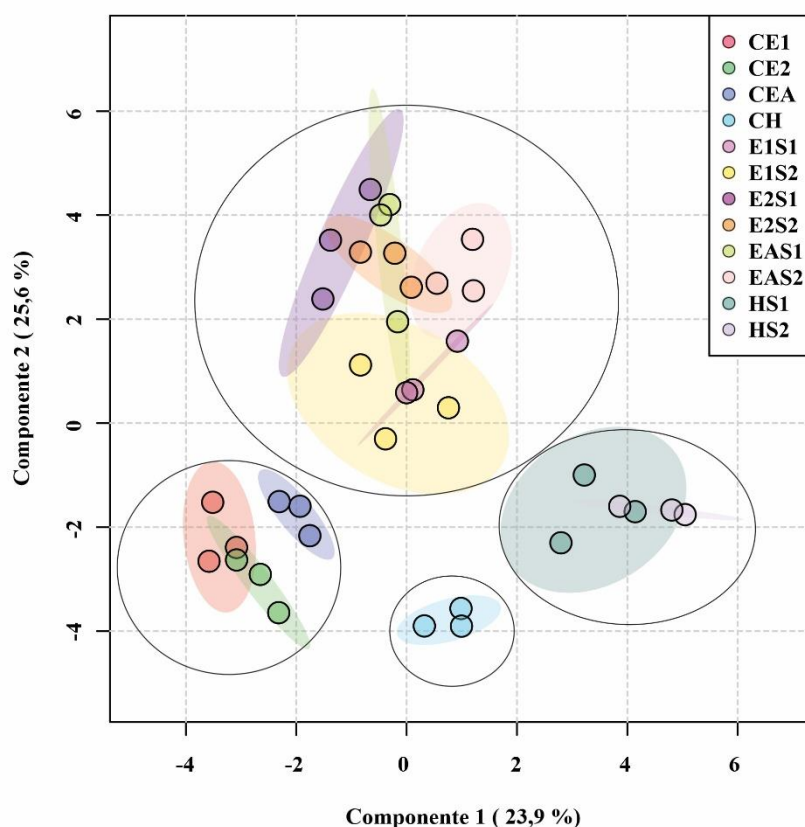
Em cada validação cruzada, os dados previstos são comparados com os dados originais, e a soma dos erros quadrados é calculada. O erro de previsão é então resumido em todas as amostras (Soma Residual Prevista de Quadrados ou PRESS). Por conveniência, o PRESS é dividido pela soma inicial de quadrados e subtraído de 1 para se assemelhar à escala do  $R^2$ .

O componente 1 e 2 são capazes de explicar 49,5 % da variância total do conjunto de dados (Figura 11). Os extratos das amostras comerciais CE1, CE2, CEA formaram um agrupamento entre si. Além disso, é possível visualizar um outro agrupamento entre os extratos hexânicos HR1, HR3. O extrato comercial hexânico encontra-se separado dos agrupamentos. Há um agrupamento entre os extratos etanólicos e extratos em acetato de etila *in natura*: E2R1, E2R3 e EAR1, E1R3, E1R1, EAR3.



Considerando os estádios fenológicos, o PLS-DA não exibiu separação entre os extratos. Entretanto, observou-se separação quando considerada à natureza da amostra (*in natura* e comercial) e os solventes distintos.

**Figura 11 - PLSDA geral**



CE1 = Extrato etanólico 1 produzido com a amostra comercial; CE2 = Extrato etanólico 2 produzido com a amostra comercial que sofreu extrações sucessivas previamente; CEA = Extrato com acetato de etila produzido com a amostra comercial, CH = Extrato hexânico produzido com a amostra comercial; E1R1 = Extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1; E1R3 = Extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3; E2R1 = Extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1 que sofreu extrações sucessivas previamente; E2R3 = Extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 2 sofreu extrações sucessivas previamente; EAR1 = Extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1; EAR3 = Extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3; HR1 = Extrato hexânico produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1; HR3 = Extrato com hexano produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3. O PLS-DA maximiza a covariância entre X (metabólitos) e Y (extratos). A variância exibida no gráfico acima é a variância explicada para X.

### 5.6.3 Mapa de calor geral

O agrupamento representado no mapa de calor (Figura 12) entre os extratos refere-se à similaridade no perfil metabolômico, que advém da presença de classes químicas em concentrações semelhantes.

Os extratos HR3, CH e HR1 apresentam baixas concentrações de carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 24, 29**), ácidos orgânicos (**19, 26, 28**) e estilbenoides (**18**) e altas concentrações de classes de metabólitos considerados como “outros” (**3, 4, 14**), ácidos graxos e derivados (**11, 25, 30**), alcaloides e derivados (**6, 17**), saponinas (**9, 16**), álcoois graxos (**1**), lignanas (**7**), terpenoides e derivados (**8**) e carboidratos e derivados (**12**).

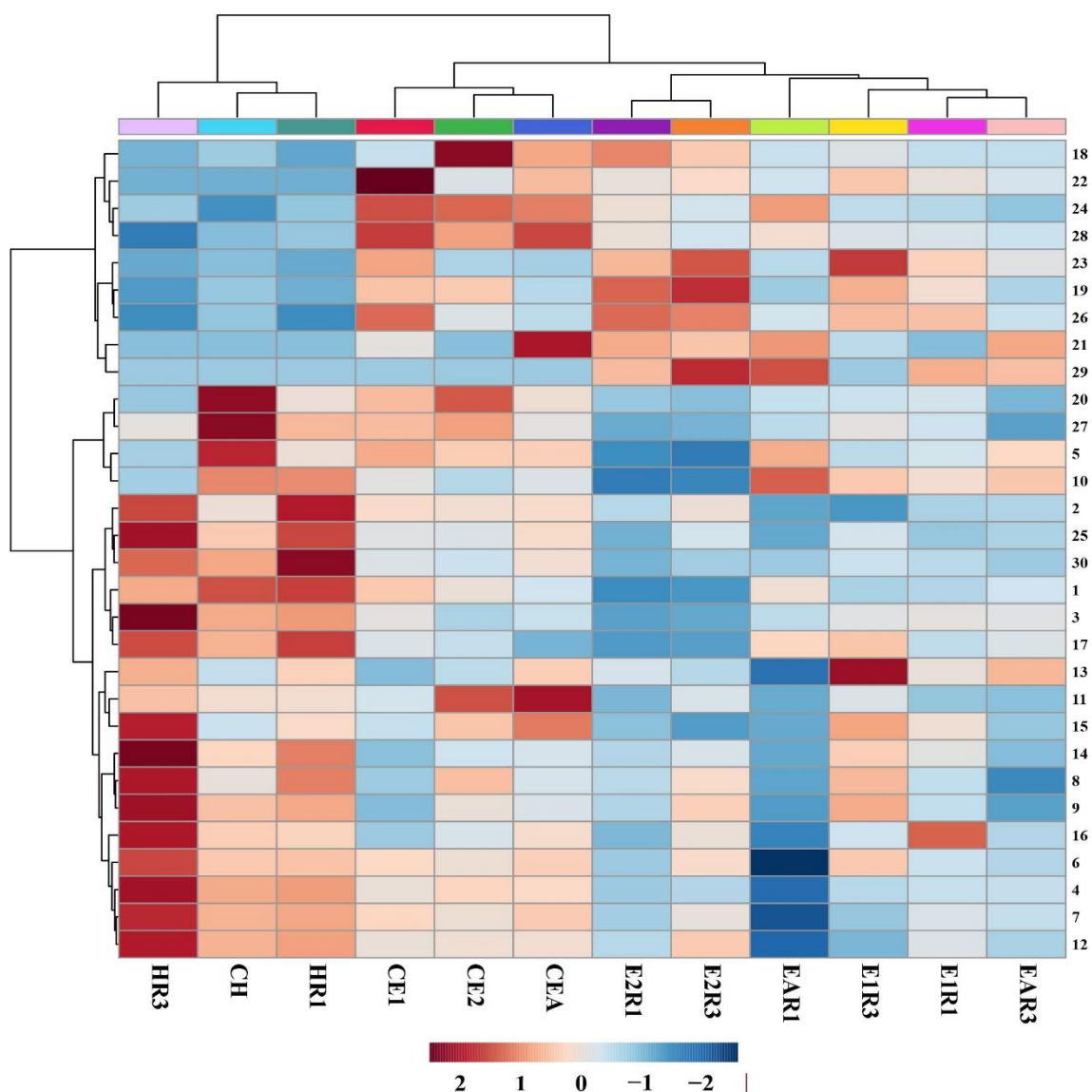
O extrato CH apresenta baixa concentração de carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 24, 29**), ácidos orgânicos (**19, 26, 28**) e estilbenoides (**18**) e altas concentrações de classes de metabólitos considerados como “outros” (**3, 4, 14**), ácidos graxos e derivados (**11, 20, 25, 27, 30**), alcaloides e derivados (**6, 17**), saponinas (**9, 16**), álcoois graxos (**1**), triterpenoides e derivados (**5**), lignanas (**7**), terpenoides e derivados (**8**), glicosídeo esteroidal (**10**), carboidratos e derivados (**12**).

Os extratos CE1, CE2, CEA apresentam altas concentrações de carboidratos e derivados (**12, 24**), ácidos orgânicos (**28**) e baixa concentração de ácidos graxos e derivados (**2**), alcaloide e derivados (**6**), lignanas (**7**), terpenoides e derivados (**5**) e dos metabólitos considerados como “outros”

Os extratos E2R1 e E2R3 apresentam baixas concentrações de ácidos graxos e derivados (**11, 20, 25, 30**), triterpenoides e derivados (**5, 15**), alcaloides e derivados (**13, 17**), classes de metabólitos considerados como “outros” (**3, 14**), álcoois graxos (**1**), glicosídeos esteroidais (**10**) e altas concentrações de carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 29**), ácidos orgânicos (**19, 26**) e estilbenoides (**18**).

Os extratos EAR1, E1R3, E1R1, EAR3 apresentam baixas concentrações de ácidos graxos e derivados (**2, 20, 25, 27, 30**), classes de metabólitos considerados como “outros” (**3, 4**), álcoois graxos (**1**), lignanas (**7**), carboidratos e derivados (**12**), estilbenoides (**18**), ácidos orgânicos (**28**) e uma média concentração de glicosídeos esteroidais (**10**).

**Figura 12** - Agrupamento hierárquico representado no mapa de calor dos dados gerais



**1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetacosenóico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propenil) propil, **4** = 7- (metílio) heptanenitrilo, **5** = 7', 8'-di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **6** = aloperina, **7** = argenteane, **8** = cassaidina, **9** = licoperósido D, **10** = notoginsenosídeo R10, **11** = linoleato de panaxidol, **12** = rutinosídeo de fenetil, **13** = piperitina, **14** = sinapaldeído espermina, **15** = syntaxantina, **16** = yiamolside B, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, **21**= eritritol, **22** = glucosamina, **23** = glicose, **24** = ácido glicérico, **25** = ácido hexadecanóico, **26** = ácido láctico, **27** = ácido linoleico **28** = ácido pirúvico, **29** = ramnose, **30** = ácido tetradecanóico.

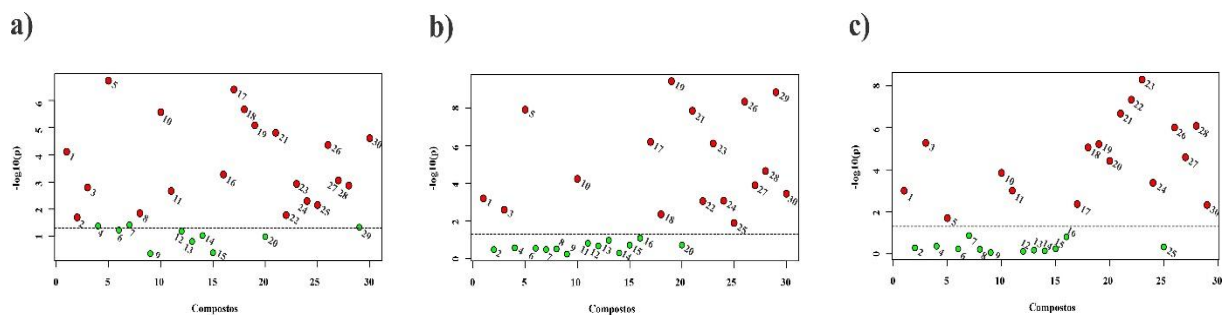
Para analisar o quão cada fator influencia no metaboloma dos extratos, as análises foram separadas por: solventes distintos (hexano, acetato de etila e etanol), estádios fenológicos R1 e R3 e natureza das amostras *in natura* e comercial.

#### **5.6.4 Inluência do solvente na variação do metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L.**

Considerando os extratos que advêm das amostras no estágio fenológico R1 os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando constatada significância as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ajustado pelo FDR, do inglês False Discovery Rate  $\leq 0,05$ . Vinte metabólitos apresentaram variação estatística significativa (Figura 13A). Estão incluídos cinco ácidos graxos e derivados (**2, 11, 25, 27, 30**), quatro carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 24**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerados como “outros” (**3**), um triterpenoide e derivados (**5**), um terpenoide e derivados (**8**), um glicosídeo esteróidal (**10**), uma saponina (**16**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**19**).

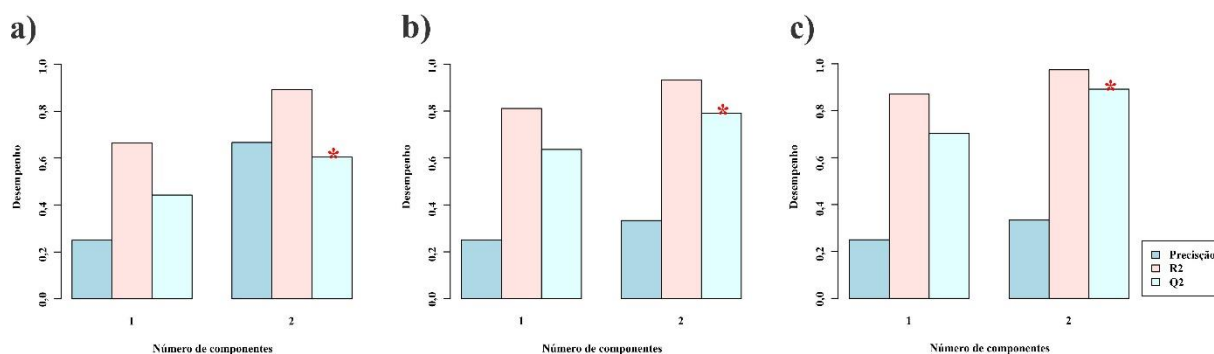
Considerando os extratos que advêm das amostras no estágio fenológico R3 os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando constatada significância, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ajustado pelo FDR, do inglês False Discovery Rate  $\leq 0,05$ . Dezesete metabólitos apresentaram variação estatística significativa (Figura 13B). Estão incluídos, cinco carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 24 29**), três ácidos graxos e derivados (**25, 27, 30**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerados como “outros” (**3**), um triterpenoides e derivados (**5**), um glicosídeo esteroidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**19**).

Considerando os extratos que advêm das amostras comerciais os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), quando constatada significância, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ajustado pelo FDR, do inglês False Discovery Rate  $\leq 0,05$ . Dezesete metabólitos apresentaram variação estatística significativa (Figura 13C). Estão incluídos, quatro carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 24**), quatro ácidos graxos e derivados (**11, 20, 27, 30**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**3**), um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**19**).

**Figura 13** - Análise de variância dos metabólitos considerando o efeito do solvente

**1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosênico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propenil) propil, **4** = 7- (metil) heptanenitrilo, **5** = 7', 8'-di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **6** = aloperina, **7** = argenteane, **8** = cassaidina, **9** = licoperósido D, **10** = notoginsenosídeo R10, **11** = linoleato de panaxidol, **12** = rutinosídeo de fenetil, **13** = piperitina, **14** = sinapaldeído espermina, **15** = sintaxantina, **16** = yiamolósido B, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **20** = ácido 9,12-octadecadiênico, **21**= eritról, **22** = glucosamina, **23** = glicose, **24** = ácido glicérico, **25** = ácido hexadecanóico, **26** = ácido láctico, **27** = ácido linoleico **28** = ácido pirúvico, **29** = rarnose, **30** = ácido tetradecanóico. As bolas vermelhas representam os metabólitos com significância estatística e as bolas verdes representam metabólitos sem significância estatística.

A robustez do modelo criado pela análise de PLS-DA foi avaliada através da validação cruzada utilizando os parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$ . Considerando o efeito dos solventes, os extratos do estágio fenológico R1, a validação cruzada apresentou  $R^2 = 89,14\%$  e  $Q^2 = 60,41\%$  (dois componentes) (Figura 14A); nos extratos do estágio fenológico R3, a validação cruzada apresentou  $R^2 = 93,19\%$  e  $Q^2 = 79,08\%$  (dois componentes) (Figura 14B); nos extratos comerciais, a validação cruzada apresentou  $R^2 = 97,43\%$  e  $Q^2 = 70,27\%$  (dois componentes) (Figura 14C). O coeficiente de Pearson ( $R^2$ ), classifica  $R^2 = 2\%$ , como baixo efeito,  $R^2 = 13\%$ , efeito médio,  $R^2 = 26\%$  efeito relevante (COHEN, 1988). Para critério de avaliação de  $Q^2$  devem ser obtidos valores maiores que zero (HAIR et al., 2014).

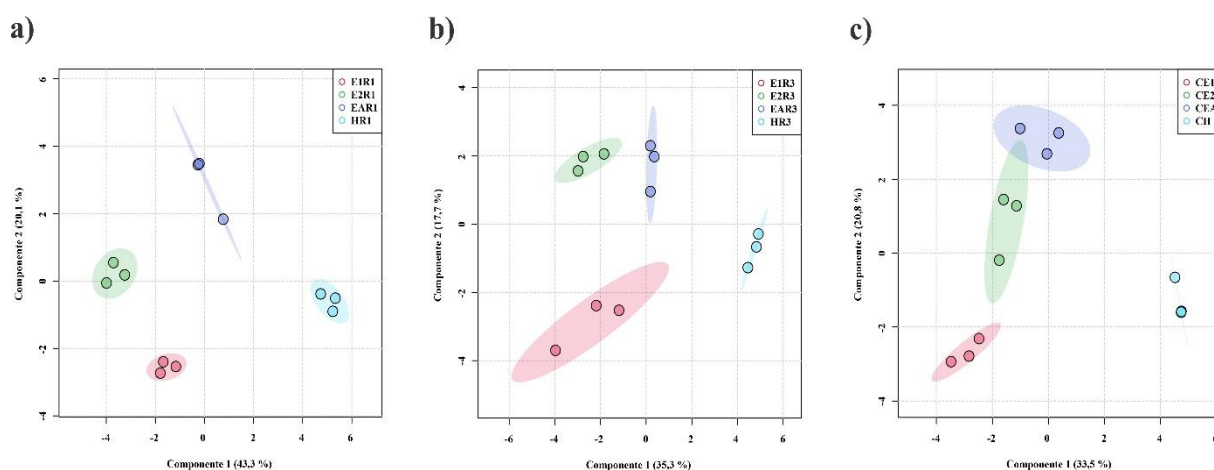
**Figura 14** - Validação cruzada do PLS-DA que avaliou a influência dos solventes na separação das amostras.

a) validação cruzada considerando os extratos do estágio fenológico R1, b) validação cruzada considerando os extratos do estágio fenológico R3 e c) validação cruzada considerando os extratos comerciais. Cada validação cruzada, os dados previstos são comparados com os dados originais, e a soma dos erros quadrados é calculada. O erro de previsão é então resumido em todas as amostras (Soma Residual Prevista de Quadrados ou PRESS). Por conveniência, o PRESS é dividido pela soma inicial de quadrados e subtraído de 1 para se assemelhar à escala do R<sup>2</sup>.

Os dois componentes são capazes de explicar 63,4% da variância total do conjunto de dados das amostras no estágio fenológico R1 (Figura 15A), 53% da variância total do conjunto de dados das amostras no estágio fenológico R3 (Figura 15B) e 54,3% da variância total do conjunto de dados das amostras comerciais (Figura 15C).

O modelo PLS-DA exibiu uma notória separação entre os extratos das amostras no estágio fenológico R1, R3 e comercial, esta última amostra, apresentou uma pequena sobreposição entre as elipses dos extratos CEA e CE2.

**Figura 15** - PLS-DA considerando a influência dos solventes



a) E1R1 = extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estágio reprodutivo 1, E2R1 = extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estágio reprodutivo 1 que sofreu extrações sucessivas previamente, EAR1 = extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estágio reprodutivo 1, HR1 = extrato hexânico produzido com a amostra do estágio reprodutivo 1; b) E1R3 = extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estágio reprodutivo 3, E2R3 = extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estágio reprodutivo 2 sofreu extrações sucessivas previamente, EAR3 = extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estágio reprodutivo 3 e HR3 = extrato com hexano produzido com a amostra do estágio reprodutivo 3; c) CE1 = extrato etanólico 1 produzido com a amostra comercial; CE2 = extrato etanólico 2 produzido com a amostra comercial que sofreu extrações sucessivas previamente; CEA = extrato com acetato de etila produzido com a amostra comercial, CH = extrato hexânico produzido com a amostra comercial. O PLS-DA maximiza a covariância entre X (metabólitos) e Y (extratos). A variância exibida no gráfico acima é a variância explicada para X.

A Impotência da Variável na Projeção (IVP) tem o objetivo de identificar quais metabólitos foram relevantes para discriminação dos extratos na projeção. As variáveis com escores maiores que 1, são consideradas as principais variáveis do modelo. As caixas coloridas

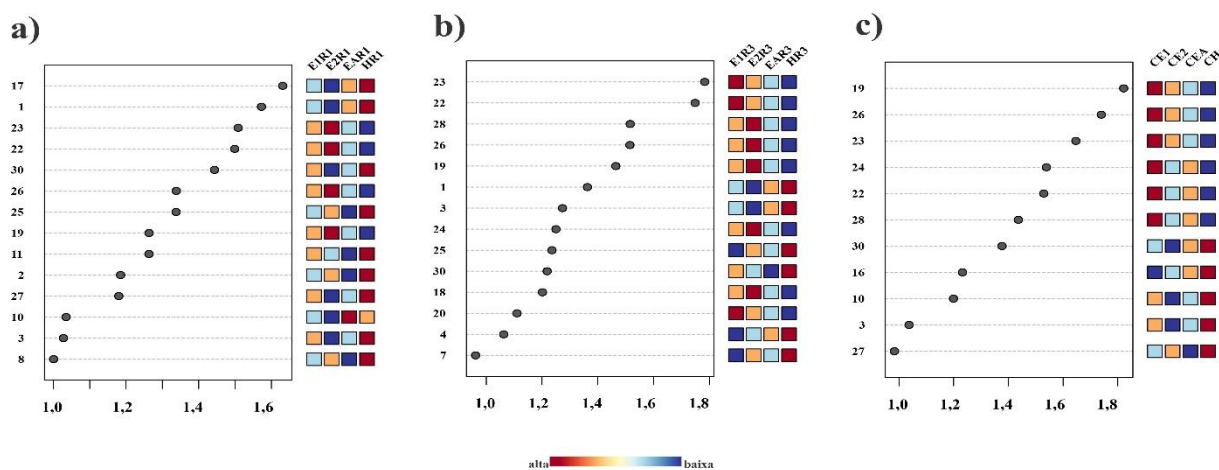
à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo de estudo. (MEHMOOD et al., 2012).

As amostras no estágio fenológico R1 apresentaram 14 metabólitos com IVP > 1, destes, cinco ácidos graxos e derivados (**2, 11, 25, 27, 30**), dois carboidratos e derivados (**22, 23**), um álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerados como “outros” (**3**), um terpenoide e derivados (**8**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), um ácido orgânico (**19**), um ácido orgânico (**26**) (Figura 16A).

As amostras no estágio fenológico R3 apresentaram 14 metabólitos com IVP > 1, destes, três carboidratos e derivados (**22, 23, 24**), três ácidos graxos e derivados (**20, 25, 30**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerados como “outro” (**3**), um glicosídeo esteróidal (**10**), uma saponina (**16**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**19**) (Figura 16B).

As amostras comerciais apresentaram 11 metabólitos com IVP > 1, destes, três carboidratos e derivados (**22, 23, 24**), dois ácidos graxos e derivados (**27, 30**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), um metabólito não classificado, considerados como “outros” (**3**), um glicosídeo esteróidal (**10**), uma saponina (**16**), um ácido orgânico (**19**) (Figura 16C).

**Figura 16** - Importância das variáveis na projeção, considerando a influência dos solventes



Valores de IVP > 1, **a)** **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **23** = glicose, **22** = glucosamina, **30** = ácido tetradecanóico, **26** = ácido láctico, **25** = ácido hexadecanóico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **11** = linoleato de panaxidol, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico, **27** = ácido linoleico, **10** = notoginsenosídeo R10, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **8** = cassaidina; **b)** **23** = glicose, **22** = glucosamina, **28** = ácido pirúvico, **26** = ácido láctico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **24** = ácido glicérico, **25** = ácido hexadecanóico, **30** = ácido tetradecanóico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo; **c)** **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **26** = ácido láctico, **23** = glicose, **24** = ácido glicérico, **22** = glucosamina, **28** = ácido pirúvico, **30** = ácido tetradecanóico, **16** = yiamolosside B, **10** = notoginsenosídeo R10, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil. As variáveis com escores maiores que 1 são consideradas as principais variáveis do modelo. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo de estudo.

### 5.6.5 A influência dos estádios fenológicos na variação do metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L.

A análise pelo volcano plot apresentou a variação entre metabólitos estatisticamente significativos entre pares de amostras extraídas com o mesmo solvente, entretanto com o estágio fenológico distinto (valor de  $p < 0,05$  e  $FC > 1,5$ ).

A comparação entre os extratos HR3 e HR1, revelou redução significativa no teor de quatro metabólitos no extrato HR3 em relação ao grupo HR1, destes, um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um ácido graxo e derivados (**20**) e um ácido orgânico (**28**) (Figura 17A).

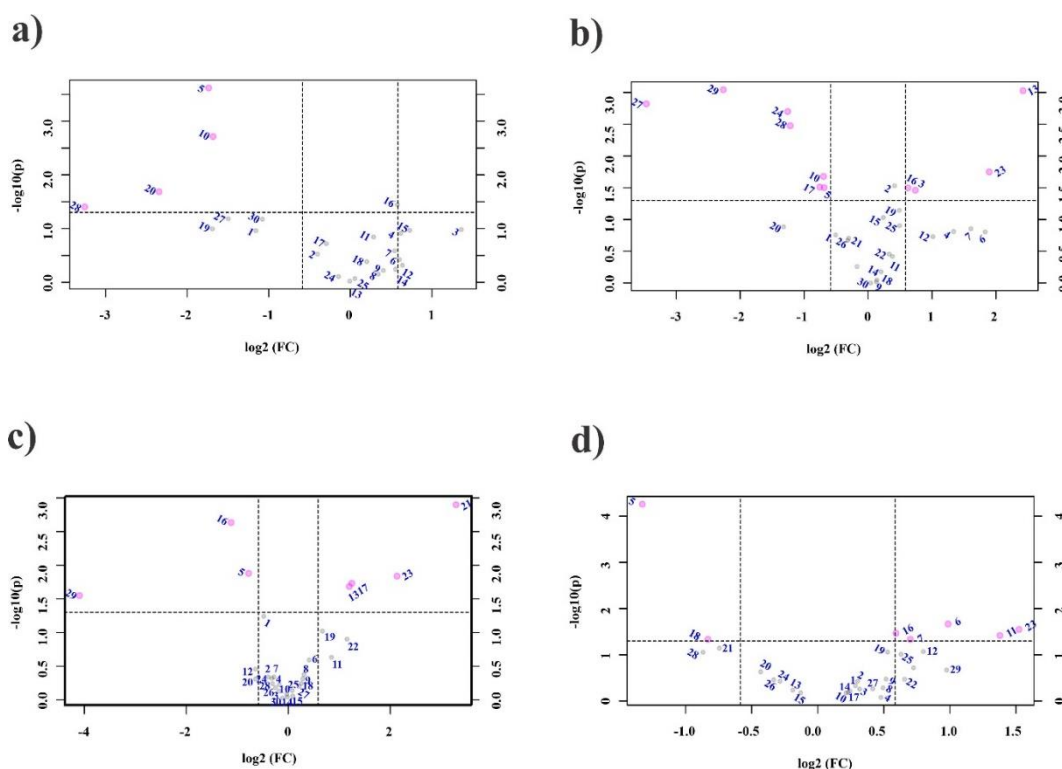
A comparação entre o extrato EAR3 e EAR1, revelou redução significativa no teor de sete metabólitos no extrato EAR3, destes, um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), dois carboidratos e derivados (**24, 29**), um ácido graxo e derivado (**27**), um ácido orgânico (**28**), e aumento significativo no teor de quatro metabólitos no extrato EAR1, destes, um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**3**), um alcaloides e derivados (**13**), uma saponina (**16**), um carboidrato e derivado (**23**) (Figura 17B).

A comparação entre os extratos E1R3 e E1R1, revelou redução significativa no teor de três metabólitos no extrato E1R3, destes, um triterpenoide e derivados (**5**), uma saponina (**16**), um carboidrato e derivado (**29**) e aumento significativo no teor de quatro metabólitos no extrato E1R1, destes, dois alcaloides e derivados (**13, 17**), dois carboidratos e derivados (**21, 23**) (Figura 17C).

A comparação entre os extratos E2R3 e E2R1 revelou redução significativa no teor de dois metabólitos no extrato E2R3, destes, um triterpenoide e derivados (**5**), um estilbenoide (**18**) e aumento significativo no teor de 5 metabólitos no extrato E2R1, destes, um alcaloide e derivados (**6**), uma lignana (**7**), um ácido graxo e derivados (**11**), uma saponina (**16**), um estilbenoide (**18**), um carboidrato e derivados (**23**) (Figura 17D).



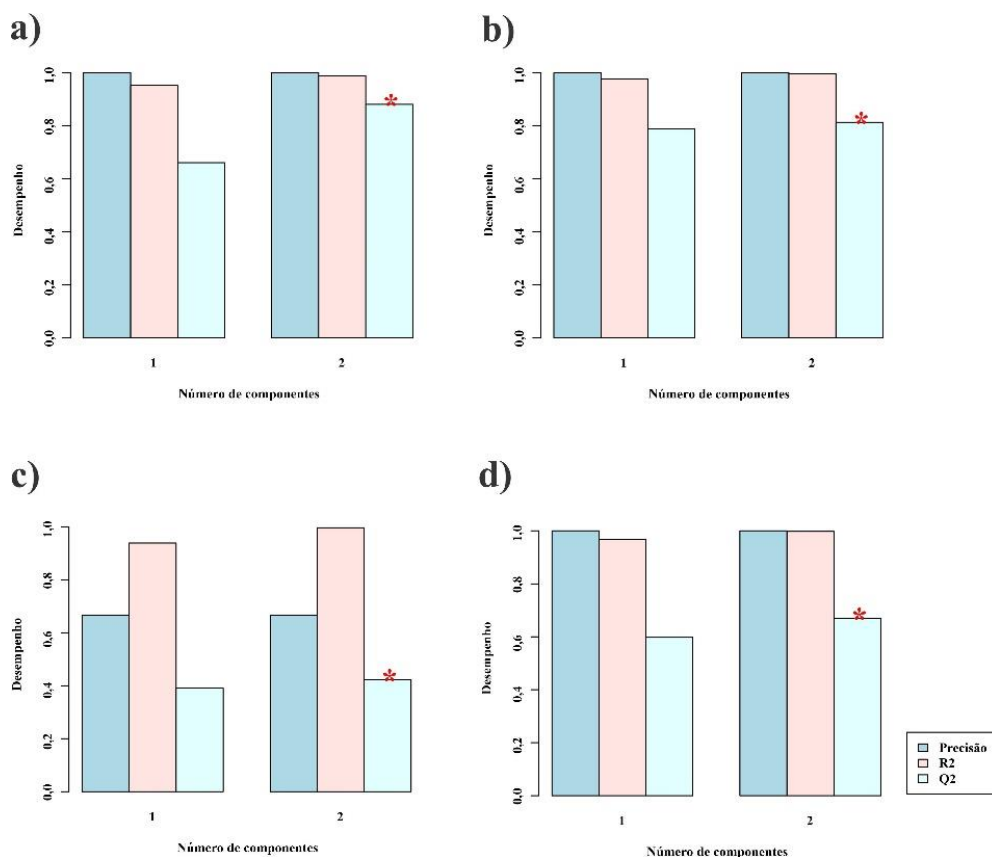
**Figura 17** - Plotagem de volcano, considerando os estádios fenológicos



Volcano Plot Fold Change (valores positivos de  $\log_2(\text{FC})$  indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste t de Student ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) para comparação entre os extratos no estágio fenológico R1 em relação ao estágio fenológico R3. a) **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **10** = notoginsenosídeo R10, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **28** = ácido pirúvico; acetato de etila b) **29** = ramnose, **13** = piperitina, **27** = ácido linoleico, **24** = ácido glicérico, **28** = ácido pirúvico, **23** = glicose, **10** = notoginsenosídeo R10, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **16** = yiamolósido B, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil; etanol 1 c) **21** = eritról, **16** = yiamolósido B, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **23** = glicose, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **13** = piperitina, **29** = ramnose; etanol 2 d) **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **6** = aloperina, **23** = glicose, **16** = yiamolósido, **11** = linoleato de panaxidol, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **7** = argenteane. Foi realizada a análise não emparelhada, o eixo X é a mudança de dobra ( $\log(\text{FC})$ ) e este parâmetro demonstra o número de contagens significativas com o limite de decisão de 1,5. O eixo Y é  $-\log_{10}$  (valor de p) é baseado em valores brutos, usando como parâmetro de significância o valor de  $p < 0,05$ . Os metabólitos significativos estão representados pelo ponto rosa e os não significativos estão representados por pontos cinza.

Nos extratos HR1 e HR3 a validação cruzada apresentou  $R^2 = 98,84\%$  e  $Q^2 = 88,07\%$  (dois componentes) (Figura 18A); nos extratos EAR1 e EAR3 a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,66\%$  e  $Q^2 = 81,34\%$  (dois componentes) (Figura 18B); nos extratos E1R1 e E1R3 a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,64\%$  e  $Q^2 = 42,38\%$  (dois componentes) (Figura 18C); nos extratos E2R1 e E2R3 a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,73\%$  e  $Q^2 = 66,98\%$  (dois componentes) (Figura 18D). O coeficiente de Pearson ( $R^2$ ), classifica  $R^2 = 2\%$ , como baixo efeito,  $R^2 = 13\%$ , efeito médio,  $R^2 = 26\%$  efeito relevante (COHEN, 1988). Para critério de avaliação de  $Q^2$ , devem ser obtidos valores maiores que zero (HAIR et al., 2014).

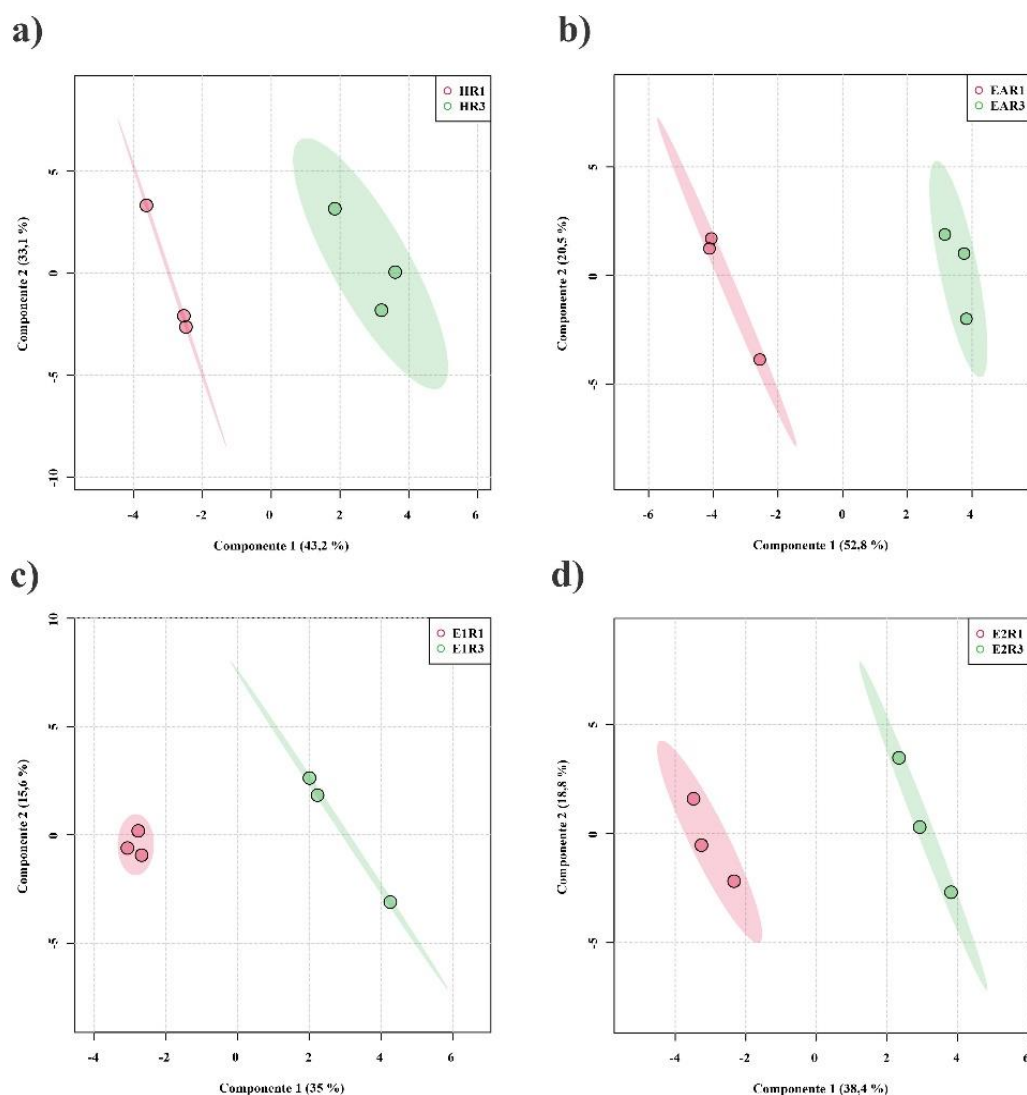
**Figura 18** - Validação cruzada do PLS-DA considerando os estádios fenológicos



**a)** validação cruzada dos extratos HR3 e HR1; **b)** validação cruzada dos extratos EAR1 e EAR3; **c)** validação cruzada dos extratos E1R1 e E1R3; **d)** validação cruzada dos extratos E2R1 e E2R3. Cada validação cruzada, os dados previstos são comparados com os dados originais, e a soma dos erros quadrados é calculada. O erro de previsão é então resumido em todas as amostras (Soma Residual Prevista de Quadrados ou PRESS). Por conveniência, o PRESS é dividido pela soma inicial de quadrados e subtraído de 1 para se assemelhar à escala do R2.

Os dois componentes são capazes de explicar 76,3% da variância dos extratos HR1 e HR3 (Figura 19A); 73,3% da variância dos extratos EAR1 e EAR3 (Figura 19B) e 50,6% da variância dos extratos E1R1 e E1R3 (Figura 19C); 57,2% da variância dos extratos E2R1 e E2R3 (Figura 19D).

Figura 19 - PLS-DA considerando a influência dos estádios fenológicos



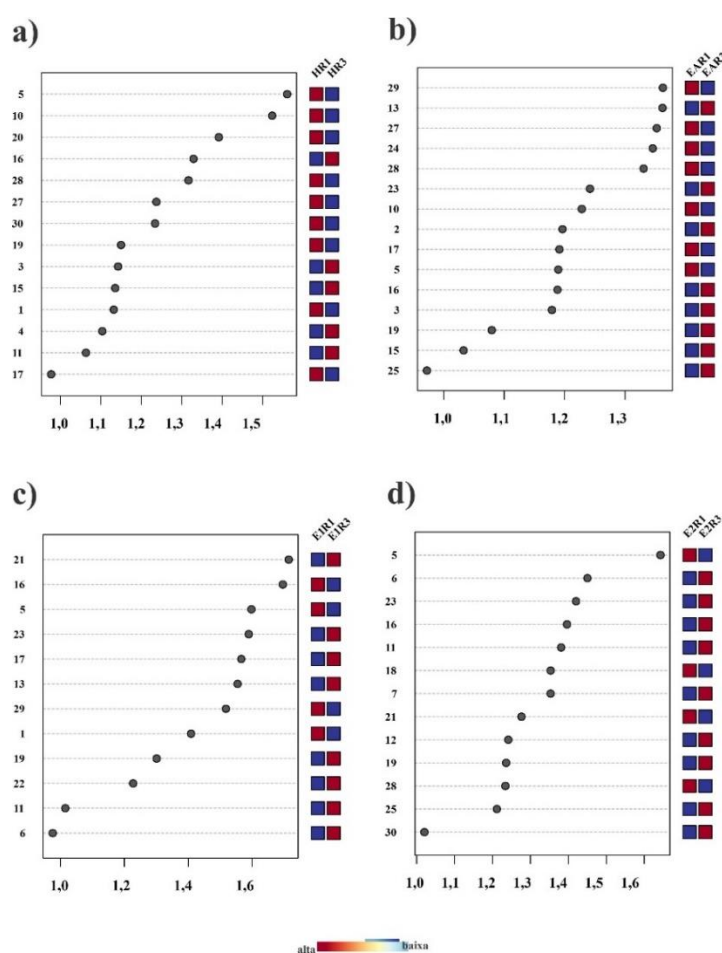
a) HR1 = extrato hexânico produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1, HR3 = extrato hexânico produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3; b) EAR1 = extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1, EAR3 = extrato com acetato de etila produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3; c) E1R1 = extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1, E1R3 = extrato etanólico 1 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 3; d) E2R1 = extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 1 que sofreu extrações sucessivas previamente, E2R3 = extrato etanólico 2 produzido com a amostra do estádio reprodutivo 2 sofreu extrações sucessivas previamente. O PLS-DA maximiza a covariância entre X (metabólitos) e Y (extratos). A variância exibida no gráfico acima é a variância explicada para X.

Considerando os extratos HR1 e HR3, foram obtidos 13 metabólitos com valores de IVP >1, destes, quatro ácidos graxos e derivados (11, 20, 27, 30), dois metabólitos não classificados, considerado como “outros” (3, 4), um álcool graxo (1), um triterpenoide e derivados (5), um

glicosídeo esteróidal (**10**), um triterpenoide e derivados (**15**), uma saponina (**16**), um ácido orgânico (**19**), um ácido orgânico (**28**). (Figura 20A).

Considerando os extratos EAR1 e EAR3, foram obtidas 14 metabólitos com valores de IVP >1, destes, três carboidratos e derivados (**23, 24, 29**), dois ácidos graxos e derivados (**2, 27**), um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**3**), um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**13**), um triterpenoide e derivados (**15**), uma saponina (**16**), um alcaloide e derivados (**17**), um ácido orgânico (**19**), um ácido orgânico (**28**) (Figura 19B).

**Figura 20** - Importância das variáveis na projeção, considerando os estádios fenológicos



Valores de IVP >1, a) **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **10** = notoginsenosídeo R10, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, **16** = yiamolósido, **28** = ácido pirúvico, **27** = ácido linoleico, **30** = ácido tetradecanoico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **15** = syntaxantina, **1** = (3R, 7R) - 1,3,7-octanetriol, **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **11** = linoleato de panaxidol; b) **29** = ramnose, **13** = pipericitina, **27** = ácido linoleico, **24** = ácido glicérico, **28** = ácido pirúvico, **23** = glicose, **10** = notoginsenosídeo R10, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosênico, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **16** = yiamolósido B, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **15** = syntaxantina; c) **21** = eritritol, **16** = yiamolósido B, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **23** = glicose, **17** =

1-cinnamoilpiperidina, **13** = piperitina, **29** = ramnose, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **22** = glucosamina, **11** = linoleato de panaxidol; d) **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **6** = aloperina, **23** = glicose, **16** = yiamolose B, **11** = linoleato de panaxidol, **18** = 1-Difenil-2-(4-metoxifenil) propeno, **7** = argenteane, **21** = eritritol, **12** = rutinosídeo de fenetilo, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **28** = ácido pirúvico, **25** = ácido hexadecanóico, **30** = ácido tetradecanóico. As variáveis com escores maiores que 1 são consideradas as principais variáveis do modelo. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo de estudo.

Considerando os extratos E1R1 e E1R3, foram obtidos 11 metabólitos com valores de IVP >, destes, quatro carboidratos e derivados (**21, 22, 23, 29**), álcool graxo (**1**), um triterpenoide e derivados (**5**), um ácido graxo e derivados (**11**), um alcaloide e derivados (**13**), uma saponina (**16**), um alcaloide e derivados (**17**), um ácido orgânico (**19**) (Figura 20 C).

Considerando os extratos E2R1 e E2R3, foram obtidos 13 metabólitos com valores de IVP >, destes, três carboidratos e derivados (**12, 21, 23**), uma saponina (**16**), um ácido orgânico (**19**), três ácidos graxos e derivados (**11, 25, 30**), um triterpenoide e derivados (**5**), um alcaloide e derivados (**6**), uma lignana (**7**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico e derivados (**28**). (Figura 20D).

### 5.6.6 A influência das amostras *in natura* e comercial na variação do metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L

A análise pelo volcano plot apresentou a variação entre os metabólitos com variação estatisticamente significativa entre pares de amostras *in natura* e comercial (valor de  $p < 0,05$  e  $FC > 1,5$ ).

A comparação entre os extratos hexânicos *in natura* (HR3, HR1) e o extrato hexânico comercial (CH) apresentou redução significativa no teor de sete metabólitos dos extratos HR1 e HR3, destes, dois ácidos graxos e derivados (**20, 27**), um triterpenoide e derivados (**5**), dois ácidos orgânicos (**19, 26**), um carboidrato e derivados (**23**), um estilbenoide (**18**) e aumento significativo no teor de quatro metabólitos no extrato CH, destes, um alcaloide e derivados (**17**), três ácidos graxos e derivados (**2, 25, 30**) (Figura 21A).

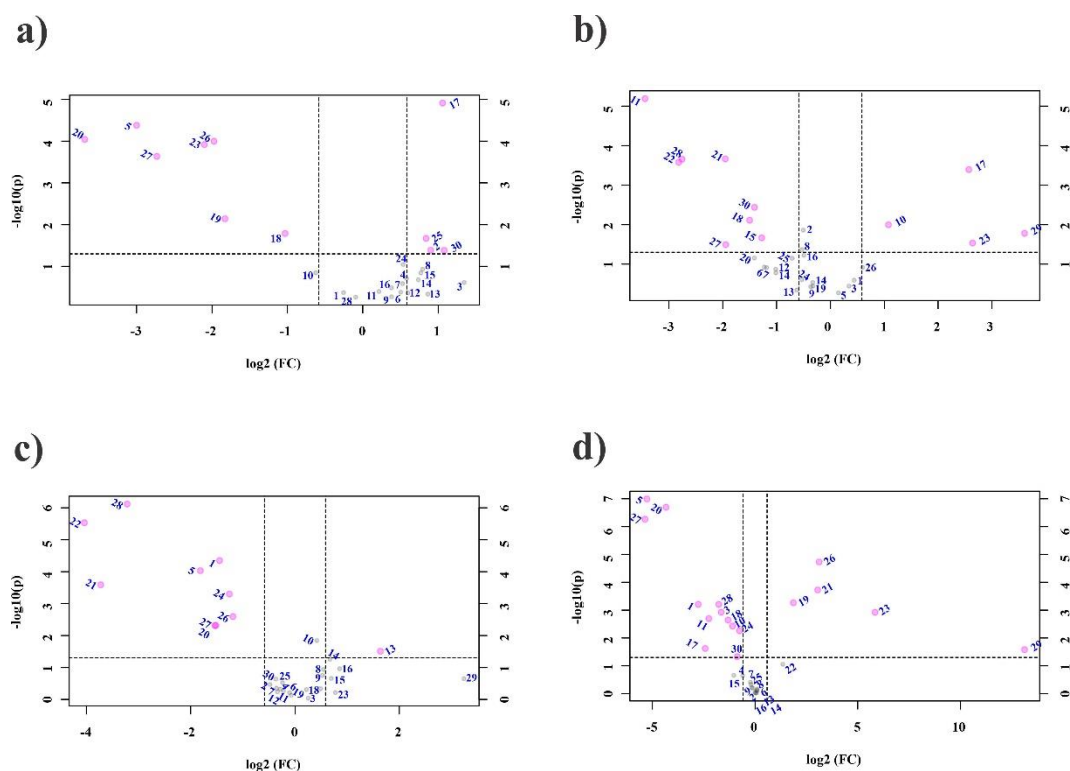
A comparação entre os extratos em acetato de etila *in natura* (EAR1 e EAR3) e o extrato em acetato de etila comercial (CEA) apresentou redução significativa no teor de oito metabólitos dos extratos EAR1 e EAR3, destes, três ácidos graxos e derivados (**11, 27, 30**), dois carboidratos e derivados (**21, 22**), um ácido orgânico (**28**), um triterpenoide e derivados (**15**), um estilbenoide (**18**) e aumento significativo no teor de quatro metabólitos no extrato CEA, destes, dois

carboidratos e derivados (**23, 29**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**) (Figura 21B).

A comparação entre os extratos etanólicos 1 *in natura* (E1R1 e E1R3) e o extrato etanólico comercial 1 (CE1) apresentou redução significativa no teor de nove metabólitos nos extratos E1R1 e E1R3, destes, três carboidratos e derivados (**22, 21, 24**), três ácidos graxos e derivados (**20, 27**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um triterpenoide e derivados (**5**) e aumento significativo no teor de um alcaloide e derivados (**13**) no extrato CE1 (Figura 21C).

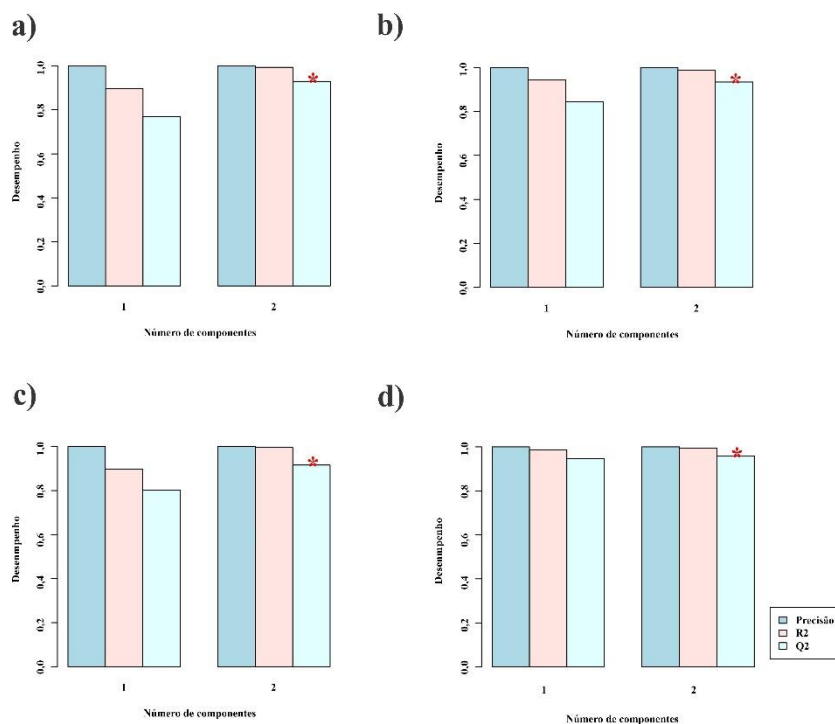
A comparação entre os extratos em etanol 2 *in natura* (E2R1 e E2R3) e o extrato comercial 2 (CE2), apresentou redução significativa no teor de doze metabólitos nos extratos E2R1 e E2R3, destes, quatro ácidos graxos e derivados (**11, 20, 27, 30**), um álcool graxo (**1**), um triterpenoide e derivados (**5**), um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**3**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um carboidrato e derivado (**24**), um ácido orgânico (**28**) e aumento significativo no teor de cinco metabólitos, destes, dois carboidratos e derivados (**21, 23**), dois ácidos orgânicos (**19, 26**), um ácido graxo e derivado (**20**) (Figura 21D).

Figura 21 - Plotagem de volcano, considerando os extratos in natura e comercial



Volcano Plot Fold Change (valores positivos de  $\log_2(\text{FC})$  indicam aumento dos metabólitos e vice-versa) e Teste t de Student ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) para comparação entre os extratos *in natura* e comercial. Os pontos rosas representam os metabólitos estatisticamente significativos nos extratos em hexano **a**) **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, **26** = ácido láctico, **23** = glicose, **27** = ácido linoleico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **25** = ácido hexadecanóico, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosenóico, **30** = ácido tetradecanóico; acetato de etila **b**) **11** = linoleato de panaxidol; **21**= eritritol, **28** = ácido pirúvico, **22** = glucosamina, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **30** = ácido tetradecanóico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **10** = notoginsenosídeo R10, **29** = ramnose, **15** = syntaxantina, **23** = glicose, **27** = ácido linoleico; etanol **1 c**) **28** = ácido pirúvico, **22** = glucosamina, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **21**= eritritol, **24** = ácido glicérico, **26** = ácido láctico, **27** = ácido linoleico, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **13** = pipericitina; etanol **2d**) **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, **27** = ácido linoleico, **26** = ácido láctico, **21**= eritritol, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **28** = ácido pirúvico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **23** = glicose, **11** = linoleato de panaxidol, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **10** = notoginsenosídeo R10, **24** = ácido glicérico, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **29** = ramnose, **30** = ácido tetradecanóico. Foi realizada a análise não emparelhada, o eixo X é a mudança de dobra ( $\log(\text{FC})$ ) e este parâmetro demonstra o número de contagens significativas com o limite de decisão de 1,5. O eixo Y é  $-\log^{10}$  (valor de p) é baseado em valores brutos, usando como parâmetro de significância o valor de  $p < 0,05$ . Os metabólitos significativos estão representados pelo ponto rosa e os não significativos estão representados por pontos cinza.

A robustez do modelo criado pela análise de PLS-DA foi avaliada através da validação cruzada utilizando os parâmetros  $R^2$  e  $Q^2$ . Considerando considerando a influência da natureza *in natura* e comercial na discriminação dos extratos hexânicos *in natura* (HR1 e HR3) e o extrato hexânico comercial (CH), a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,34\%$  e  $Q^2$  de  $92,93\%$  (dois componentes) (Figura 22A); nos extratos em acetato de etila *in natura* (EAR1 e EAR3) e o extrato em acetato de etila comercial (CEA), a validação cruzada apresentou  $R^2 = 98,83\%$  e  $Q^2 = 93,33\%$  (dois componentes) (Figura 22B); nos extratos etanólicos *in natura* (E1R1 e E1R3) e o extrato etanólico comercial 1 (CE1), a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,60\%$  e  $Q^2 = 91,59\%$  (dois componentes) (Figura 22C); nos extratos em acetato de etila *in natura* (E2R1 e E2R3) e o extrato comercial 2 (CE2), a validação cruzada apresentou  $R^2 = 99,45\%$  e  $Q^2 = 95,83\%$  (dois componentes) (Figura 22D). O coeficiente de Pearson ( $R^2$ ), classifica  $R^2 = 2\%$ , como baixo efeito,  $R^2 = 13\%$ , efeito médio,  $R^2 = 26\%$  efeito relevante (COHEN, 1988). Para critério de avaliação de  $Q^2$  devem ser obtidos valores maiores que zero (HAIR et al., 2014).

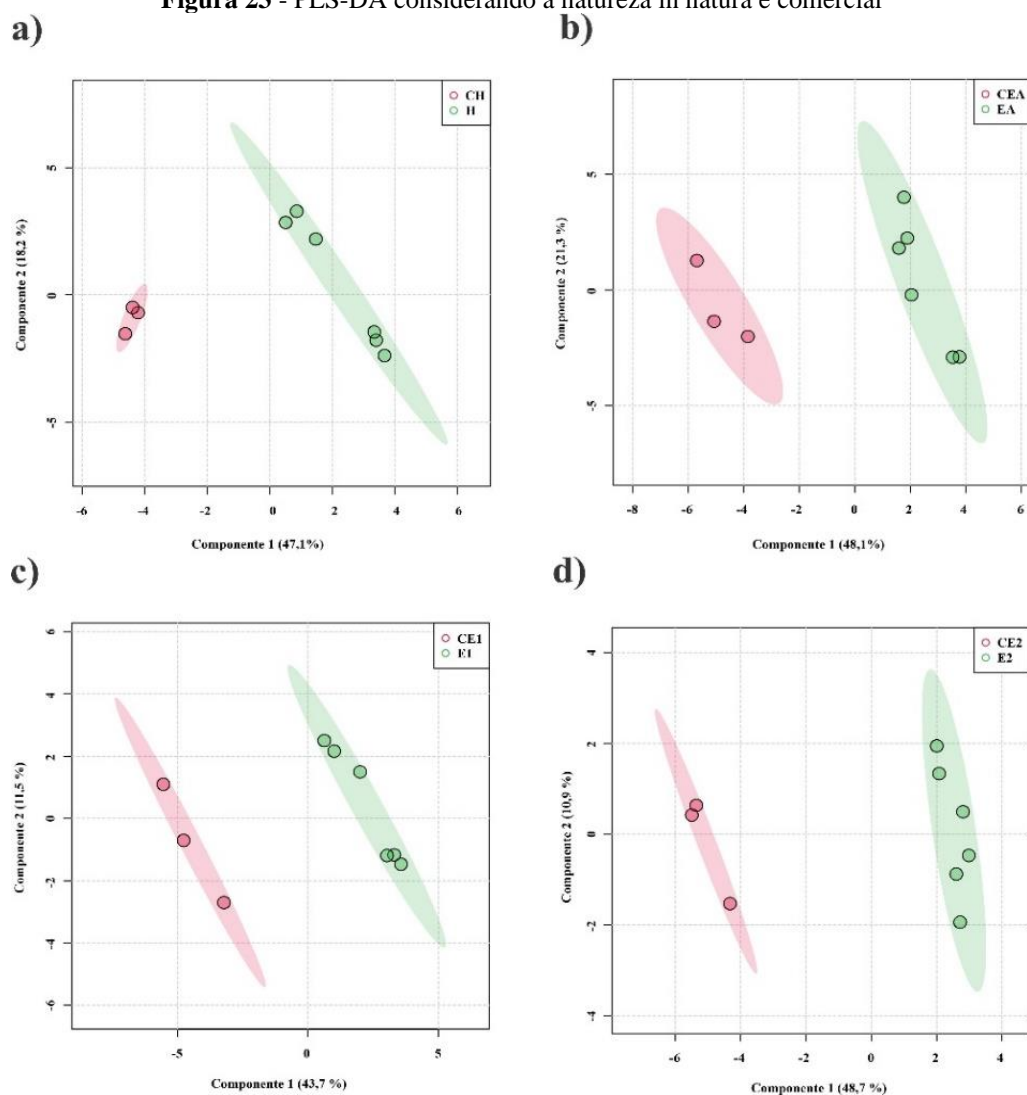
**Figura 22** - Validação cruzada do PLS-DA considerando a natureza *in natura* e comercial

**a)** validação cruzada dos extratos HR1, HR3 e CH; **b)** validação cruzada dos extratos EAR1, EAR3 e CEA; **c)** validação cruzada dos extratos E1R1, E1R3 e CE1 **d)** validação cruzada dos extratos E2R1, E2R3 e CE2. Cada validação cruzada, os dados previstos são comparados com os dados originais, e a soma dos erros quadrados é calculada. O erro de previsão é então resumido em todas as amostras (Soma Residual Prevista de Quadrados ou PRESS). Por conveniência, o PRESS é dividido pela soma inicial de quadrados e subtraído de 1 para se assemelhar à escala do R2.

Os dois componentes são capazes de explicar 65,3% da variância dos extratos hexânicos *in natura* (HR1 e HR3) e o extrato hexânico comercial (CH) (Figura 23A); 69,4 % da variância dos extratos em acetato de etila *in natura* (EAR1 e EAR3) e o extrato em acetato de etila comercial (CEA) (Figura 23B), 55,2% da variância dos extratos etanólicos *in natura* (E1R1 e E1R3) e o extrato etanólico comercial 1 (CE1) (Figura 23C); 59,6% da variância dos extratos em acetato de etila *in natura* (E2R1 e E2R3) e o extrato comercial 2 (CE2) (Figura 23D).



**Figura 23** - PLS-DA considerando a natureza *in natura* e comercial



Considerando os extratos hexânicos *in natura* (HR1 e HR3) e o extrato hexânico comercial (CH), foram obtidas 11 variáveis com valores de IVP >1, e consideradas como potenciais metabólitos para esses dados. Segue os metabólitos com importância na projeção: cinco ácidos graxos e derivados (**2**, **20**, **25**, **27**, **30**), dois ácidos orgânicos (**19**, **26**), um triterpenoide e derivados (**5**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um carboidrato e derivados (**23**) (Figura 24A).

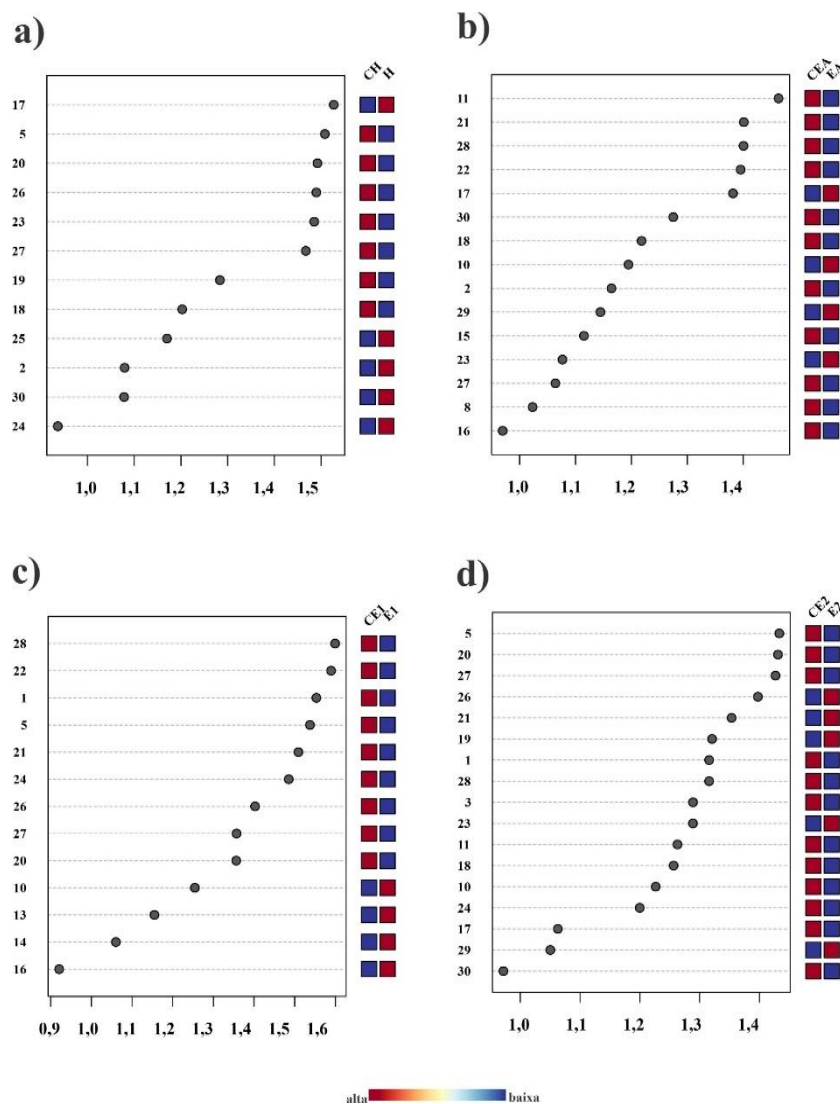
Considerando os extratos em acetato de etila *in natura* (EAR1 e EAR3) e o extrato em acetato de etila comercial (CEA), foram obtidas 14 variáveis com valores de IVP >1, e consideradas como potenciais metabólitos para esses dados. Segue os metabólitos com importância na projeção: quatro carboidratos e derivados (**21**, **22**, **23**, **29**), quatro ácidos graxos e derivados (**2**, **11**, **27**, **30**), um terpenoide e derivado (**8**), um glicosídeo esteróide (**10**), um

triterpenoide e derivado (**15**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**28**) (Figura 24B).

Considerando os extratos etanólicos *in natura* (E1R1 e E1R3) e o extrato etanólico comercial 1 (CE1), foram obtidas 12 variáveis com valores de IVP >1, e consideradas como potenciais metabólitos para esses dados. Segue os metabólitos com importância na projeção: três carboidratos e derivados (**21, 22, 24**), um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**14**), um álcool graxo (**1**), um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**13**), dois ácidos graxos e derivados (**20, 27**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**) (Figura 24C).

Considerando os extratos em acetato de etila *in natura* (E2R1 e E2R3) e o extrato comercial 2, foram obtidas 16 variáveis com valores de IVP >1, e consideradas como potenciais metabólitos para esses dados. Segue os metabólitos com importância na projeção: quatro carboidratos e derivados (**21, 23, 24, 29**), três ácidos graxos e derivados (**11, 20, 27**), dois ácidos orgânicos (**26, 28**), álcool graxo (**1**), um metabólito não classificado, considerado como “outros” (**3**), um triterpenoide e derivados (**5**), um glicosídeo esteróidal (**10**), um alcaloide e derivados (**17**), um estilbenoide (**18**), um ácido orgânico (**19**) (Figura 24D).

**Figura 24** - Importância das variáveis na projeção, considerando a natureza in natura e comercial



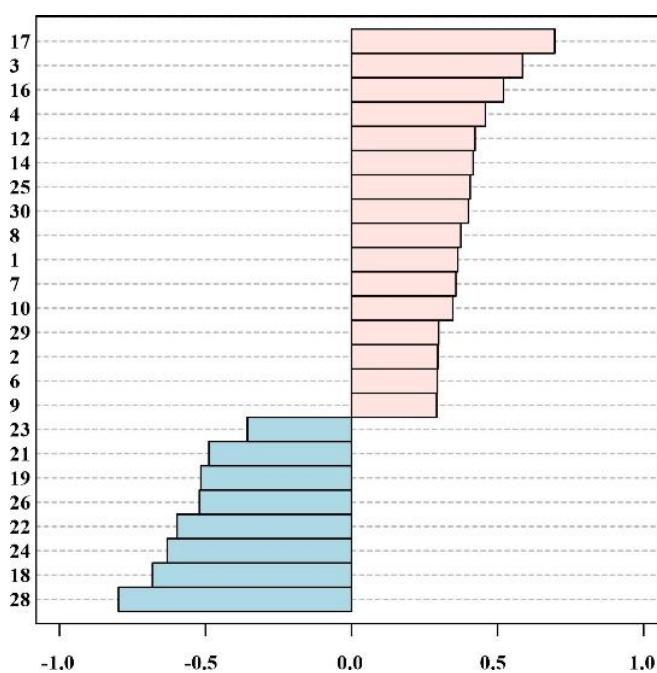
Valores de IVP >1, **a)** **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **26** = ácido láctico, **23** = glicose, **27** = ácido linoleico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **25** = ácido hexadecanóico, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosenóico, **30** = ácido tetradecanóico; **b)** **11** = linoleato de panaxidol, **21**= eritritol, **28** = ácido pirúvico, **22** = glucosamina, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **30** = ácido tetradecanóico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **10** = notoginsenosídeo R10, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetracosenóico, **29** = ramnose, **15** = sintaxantina, **23** = glicose, **27** = ácido linoleico, **8** = cassaidina; **c)** **28** = ácido pirúvico, **22** = glucosamina, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **21**= eritritol, **24** = ácido glicérico, **26** = ácido láctico, **27** = ácido linoleico, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **10** = notoginsenosídeo R10, **13** = piperitina, **14** = sinapaldeído espermina; **d)** **5** = 7', 8'-Di-hidro-8'-hidroxicitranixantina, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **27** = ácido linoleico, **26** = ácido láctico, **21**= eritritol, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **28** = ácido pirúvico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **23** = glicose, **11** = linoleato de panaxidol, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **10** = notoginsenosídeo R10, **24** = ácido glicérico, **17** = 1-cinnamoilpiperidina **29** = ramnose, **30** = ácido tetradecanóico. As variáveis com escores maiores que 1 são consideradas as principais variáveis do modelo. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente em cada grupo de estudo.

### 5.6.7 Correlação entre as atividades biológicas e os metabólitos

O coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) é uma medida bastante utilizada para descrever a relação não-linear. Os seguintes parâmetros foram utilizados para interpretar a correlação: O  $\rho = 0,00$  a  $0,3$ , positivo ou negativo, indica uma correlação desprezível; o  $\rho = 0,3$  a  $0,5$ , positivo ou negativo, indica uma correlação fraca; o  $\rho = 0,5$  a  $0,7$ , positivo ou negativo, indica uma correlação moderada; o  $\rho = 0,7$  a  $0,9$ , positivo ou negativo, indica uma correlação forte; o  $\rho = 0,9$  a  $0,99$ , positivo ou negativo indica uma correlação muito forte (MUKAKA, 2012).

O coeficiente de Spearman indentificou uma correlação negativa e forte entre a atividade antioxidante e o ácido pirúvico (**28**), porém não significativa ( $p > 0,05$ ); e uma correlação negativa e moderada entre a atividade antioxidante e o 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno (**18**), ácido glicérico (**24**), glucosamina (**22**), porém não significativa ( $p > 0,05$ ), ácido láctico (**26**), ácido 2-ceto-L-glucônico (**19**) com significância estatística ( $p < 0,05$ ); e uma correlação positiva e moderada entre a atividade antioxidante e a 1-cinnamoilpiperidina (**17**), dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil (**3**), porém não significativa ( $p > 0,05$ ), yiamolosite B (**16**) com significância estatística ( $p < 0,05$ ) (Figura 25).

**Figura 25** - Correlação entre os compostos fenólicos e e os metabólitos dos extratos

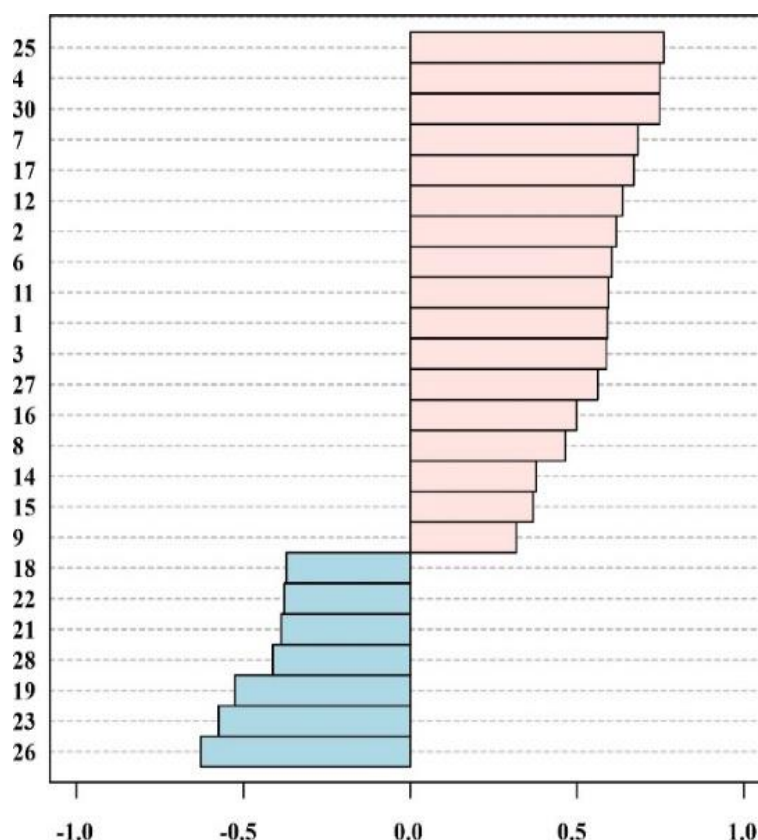


O coeficiente de correlação de Spearman considerou valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis: **17** = 1-

cinnamoilpiperidina, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **16** = yiamolside B, **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **12** = rutinosídeo de fenetil, **14** = sinapaldeído espermina, **25** = ácido hexadecanóico, **30** = ácido tetradecanóico, **8** = cassaidina, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **7** = argenteane, **10** = notoginsenosídeo R10, **29** = ramnose, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico, **6** = aloperina, **9** = licoperósido D, **23** = glicose, **21** = eritról, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **26** = ácido láctico, **22** = glucosamina, **24** = ácido glicérico, **18** = 1-Difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **28** = ácido pirúvico.

O coeficiente de Spearman indentificou uma correlação positiva e forte entre a atividade citotóxica contra células C6 e o ácido hexadecanóico (**25**), 7- (metiltio) heptanenitrilo (**4**), ácido tetradecanóico (**30**); correlação positiva e moderada entre a atividade citotóxica contra células C6 e a argenteane (**7**), 1-cinnamoilpiperidina (**17**), rutinosídeo de fenetil (**12**), ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico (**2**), aloperina (**6**), linoleato de panaxidol (**11**), (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol (**1**), dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil (**3**), ácido linoleico (**27**), e correlação negativa e moderada entre a atividade citotóxica contra células C6 e o ácido láctico (**26**), glicose (**23**), porém não significante ( $p > 0,05$ ), ácido 2-ceto-L-glucônico (**19**) (Figura 26).

**Figura 26** - Correlação entre a atividade citotóxica contra células C6 e os metabólitos

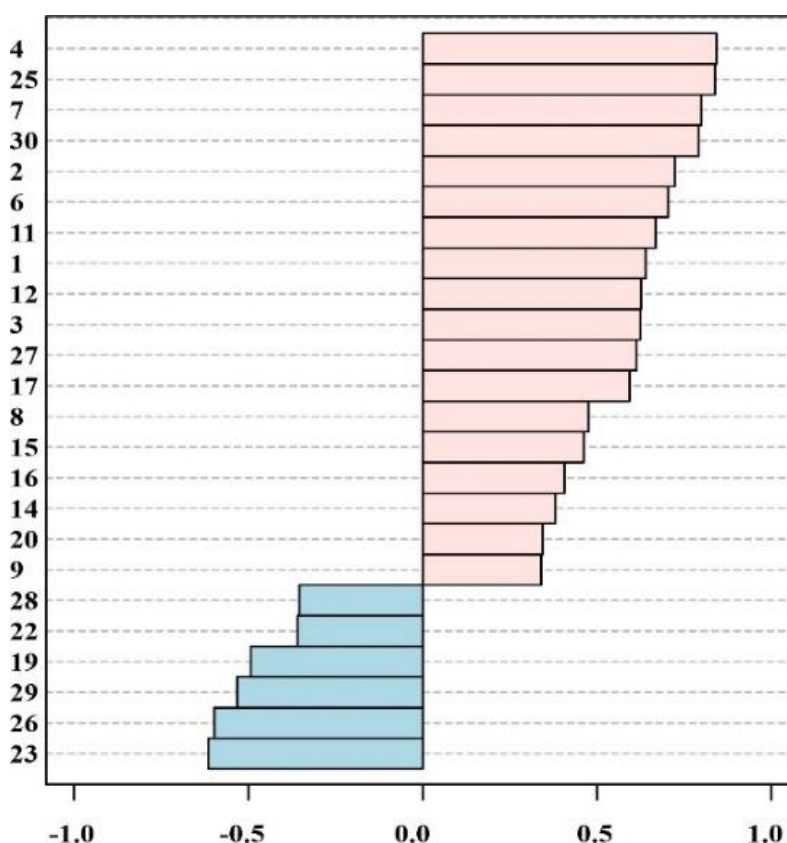


O coeficiente de correlação de Spearman considerou valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis: **25** = ácido hexadecanóico, **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **30** = ácido tetradecanóico, **7** = argenteane, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **12** = rutinosídeo de fenetil, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico, **6** = aloperina, **11** = linoleato de panaxidol, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **27** = ácido linoleico, **16** = yiamolside B, **8** = cassaidina, **14** = sinapaldeído espermina, **15** = syntaxantina, **9** =

licoperósido D, **18** = 1-difenil-2- (4-metoxifenil) propeno, **22** = glucosamina, **21** = eritritol, **28** = ácido pirúvico, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **23** = glicose, **26** = ácido láctico.

O coeficiente de Spearman indentificou uma correlação positiva e forte entre a atividade antibacteriana (*B. subtilis*) e o 7- (metiltio) heptanenitrilo (**4**), ácido hexadecanoico (**25**), argenteane (**7**), ácido tetradecanóico (**30**), ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico (**2**), aloperina (**6**); correlação positiva e moderada entre a atividade antibacteriana (*B. subtilis*) e o linoleato de panaxidol (**11**), (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol (**1**), rutinosídeo de fenetil (**12**), dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil (**3**), ácido linoleico (**27**), 1-cinnamoilpiperidina (**17**); e correlação negativa e moderada entre a atividade antibacteriana (*B. subtilis*) e a glicose (**23**), ácido láctico (**26**), ramnose (**29**) (Figura 27).

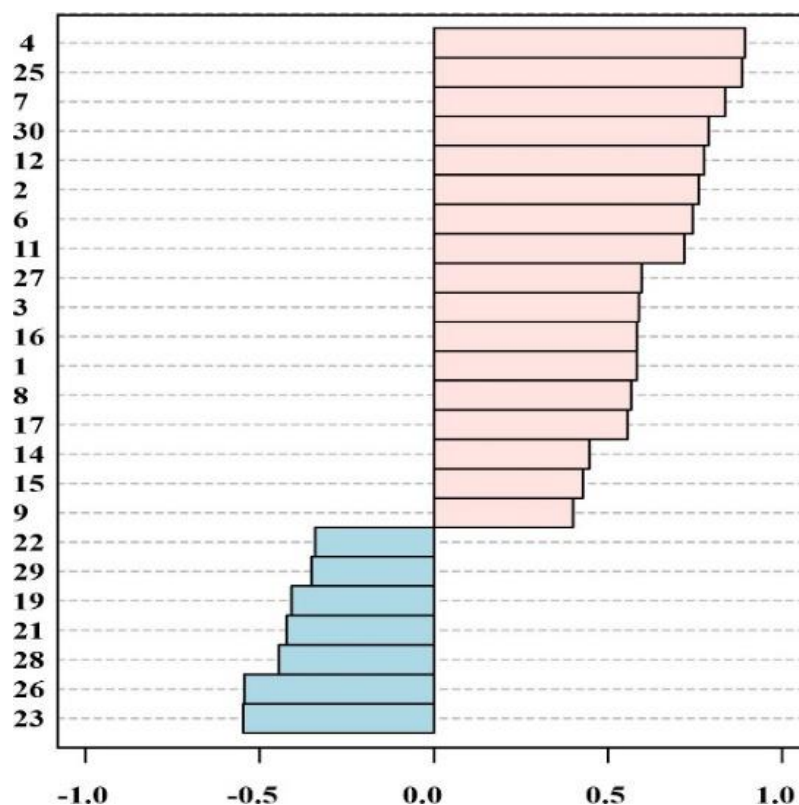
**Figura 27** - Correlação entre a atividade antibacteriana frente ao *B. subtilis* e os metabólitos



O coeficiente de correlação de Spearman considerou valores de  $\rho > 0$  = correlação positiva e valores de  $\rho < 0$  = correlação negativa. Valores de  $\rho$  mais próximos de 1 representa correlação mais forte entre as variáveis: **4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **25** = ácido hexadecanoico, **7** = argenteane, **30** = ácido tetradecanóico, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico, **6** = aloperina, **11** = linoleato de panaxidol, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **12** = rutinosídeo de fenetil, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **27** = ácido linoleico, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **8** = cassaidina, **15** = syntaxantina, **16** = yiamolósido B, **14** = sinapaldeído espermina, **20** = ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico, **9** = licoperósido D, **28** = ácido pirúvico, **22** = glucosamina, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **29** = ramnose, **26** = ácido láctico, **23** = glicose.

O coeficiente de Spearman indentificou uma correlação positiva e forte entre a atividade antibacteriana (*P. aeruginosa*) e 7- (metiltio) heptanenitrilo (**4**), ácido hexadecanóico (**25**), argenteane (**7**), ácido tetradecanóico (**30**), rutinosídeo de fenetilo (**12**), ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico (**2**), aloperina (**6**), linoleato de panaxidol (**11**); correlação positiva e moderada entre a atividade antibacteriana (*P. aeruginosa*) e ácido linoleico (**27**), dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil (**3**), yiamoloside B (**16**), (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol (**1**), cassaidina (**8**), 1-cinnamoilpiperidina (**17**); e correlação negativa e moderada entre a atividade antibacteriana (*P. aeruginosa*) e a glicose (**23**), ácido láctico (**26**) (Figura 28).

**Figura 28** - Correlação entre a atividade antibacteriana frente ao *P. aeruginosa* e os metabólitos



**4** = 7- (metiltio) heptanenitrilo, **25** = ácido hexadecanóico, **7** = argenteane, **30** = ácido tetradecanóico, **12** = rutinosídeo de fenetilo, **2** = ácido 15-oxo-18Z-tetradecosenóico, **6** = aloperina, **11** = linoleato de panaxidol, **27** = ácido linoleico, **3** = dissulfeto de 1-propenil 1- (1-propeniltio) propil, **16** = yiamoloside B, **1** = (3R, 7R) -1,3,7-octanetriol, **8** = cassaidina, **17** = 1-cinnamoilpiperidina, **14** = sinapaldeído espermina, **15** = sintaxantina, **9** = licoperósido D, **22** = glucosamina, **29** = ramnose, **19** = ácido 2-ceto-L-glucônico, **21** = eritritol, **28** = ácido pirúvico, **26** = ácido láctico, **23** = glicose.



## 6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais sintetizam biomoléculas que são utilizadas como base para produção de muitas drogas farmacêuticas e fitoterápicos. Estas moléculas ativas presente em plantas possuem atividades biológicas benéficas para a saúde humana, além disso estão presentes na produção de perfumes, agroquímicos e cosméticos (LI et al., 2020).

A plantas medicinais apresentam diversas atividades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante (GUTTERIDGE; HALLIWEL, 2015), atividade antimicrobiana (ALEKSIC SABO; KNEZEVIC et al., 2019) e atividade citotóxica (OCHWANG'I et al., 2018).

Existe uma relação entre uma dieta rica em metabólitos com propriedade antioxidantes e a proteção frente às doenças relacionadas com o dano oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas (TRESSERRA-RIMBAU, ARRANZ, VALLVERDU-QUERALT, 2017). Logo, é importante a descoberta de novas fontes de metabólitos secundários com atividade antioxidante.

No presente estudo os extratos *in natura* do estágio R1, apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados aos extratos produzidos a partir da amostra coletada no estágio R3 e comercial. Os dados apresentados no estudo atual estão de acordo com o experimento de Zilic et al., (2016), que utilizou o estigma de milho híbrido ZP no estágio R1, este extrato apresentou maior atividade antioxidante ( $IC_{50} = 0,059 \text{ mg mL}^{-1}$ ) quando comparado com o extrato do estágio R4 ( $IC_{50} = 0,180 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A maior atividade antioxidante das amostras R1 quando comparadas com as amostras R4, advém da oxidação dos polifenóis e da formação de seus derivados durante a maturação e envelhecimento do estigma. Este resultado mostra que o extrato que advém de uma amostra coletada no início do estágio reprodutivo, apresenta maior atividade antioxidante (AKBARI; DIDEHBAN; FARHANG, 2020).

No presente estudo, o etanol apresentou maior potencial em extrair metabólitos com propriedade antioxidante. Este achado pode estar relacionado pela afinidade entre solventes polares e o conteúdo de agente redutores e compostos fenólico presente no extrato. Corroborando com este achado, foi avaliado em outro trabalho que o extrato polar da maioria dos vegetais tem propriedades antioxidantes mais altas do que o extrato apolar (OBOH; RADDATZ; HENLE, 2008). A atividade antioxidante dos extratos da *Crinum asiaticum* L. variou de acordo com a polaridade dos extratos: éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Através do método DPPH os valores de  $IC_{50}$  foram de 241,9, 195,7, 122,2 e 148,1  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados reforçam que a polaridade do solvente influencia na



atividade antioxidante (GOSWAMI et al., 2020). Os extratos brutos de *Juniperus excels* foram testados usando o método DPPH, os extratos com maior atividade foram: hidroalcoólico> clorofórmio> acetato de etila> hexano (WELI et al., 2014). A maior atividade antioxidante dos atividade deve estar relacionada ao seu conteúdo fenólico,

A análise de correlação identificou a ramnose (29) como o principal metabólito responsável pela atividade antioxidante, mesmo não apresentando a maior correlação, este metabólito apresentou significância estatística (Figura 24). Em outro trabalho, a atividade antioxidante da fração do polissacarídeo de estigma de milho, identificou a ramnose entre outros três monossacarídeos, este extrato foi avaliado e apresentou atividade de sequestro do radical DPPH com valor de 0,46 mg mL (LI et al., 2020). Alguns monossacarídeos foram avaliados e apresentaram baixa atividade antioxidante (TOUKACH; ANANIKOV, 2013). Em outro trabalho, onde foi avaliada a atividade antioxidante de complexos de lignina-carboidrato, os polissacarídeos polissacarídeo apresentou um papel crucial como doador de hidrogênio para encerrar as reações em cadeia de radicais ou sintetizar produtos mais estáveis (XIE et al., 2020).

A atividade antioxidante de metabólitos normalmente advém dos seus compostos fenólicos. Estes resultados têm sido associados à quantidade compostos, como flavonoides, isoflavona, flavonas, antocianina, catequina e isocatequina. Contudo, a atividade antioxidante está vinculada à quantidade de hidroxilas livres e a conjugação de cadeias laterais para os anéis aromáticos. (ELFALLEH; KIRKAN; SARIKURKCU, 2019).

Os compostos fenólicos estão presentes na alimentação diária de muitas pessoas, através do uso de especiarias, legumes e plantas (CEJUDO-BASTANTE et al., 2013; JAIME et al., 2015). As plantas possuem uma grande quantidade destes compostos, estes, minimizam ou impedem o estresse oxidativo, através do sequestro de radicais livres. Mas estes compostos apresentam outros mecanismos de ação, como por exemplo, o estímulo à dilatação endotelial, por meio do aumento a disponibilidade biológica do óxido nítrico. Outro mecanismo acontece através da inibição da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (NADPH oxidase endotelial). As induções destes mecanismos estão associadas ao menor risco de doenças cardiovasculares (MOCCIARO et al., 2019; CROFT et al., 2018). Os compostos fenólicos também têm atividade antidiabética, através da ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) nas células HepG2, melhorando assim a captação de glicose na resistência à insulina (HUANG et al., 2015).

No presente estudo, o extrato etanólico E1R1 apresentou maior teor de compostos fenólicos. Os únicos compostos fenólicos identificados neste estudo foram encontrados na

argenteane (7) e sinapaldeído espermina (14). Ambos estão mais concentrados nos extratos hexânicos. Esses extratos apresentaram baixa concentração de metabólitos vinculados com a atividade antioxidante (carboidratos e derivados e ácidos orgânicos) e possui uma grande concentração metabólitos que não apresentam boa atividade antioxidante (ácidos graxos). Em um trabalho que avaliou extratos hexânicos composto por isolados de lignanas da raiz de *Myristica fragrans*, um dos metabólitos identificado numa das frações foi a argenteane, e através do método DPPH este extrato apresentou atividade antioxidante com valor de IC<sub>50</sub> de 69,64 ppm (GINTING et al., 2020).

O presente estudo exibiu que o teor de compostos fenólicos nos extratos do estágio fenológico R1 é maior que no estágio R3, com exceção para os extratos hexânicos. O teor de compostos fenólicos possivelmente é influenciado pelo estágio fenológico. Corroborando com os resultados achados no presente o estudo, outro trabalho apresentou teor de compostos fenólicos total que variou de 26,5 µg EAG/g (milho ceroso branco, variedade WWC1 no estágio R6) a 206,8 µg EAG/g (milho ceroso roxo, variedade PWC5 no estágio R4), apresentando assim uma diferença no teor de compostos fenólicos de acordo com o estágio fenológico (SAPEROUCA et al 2015)

No presente estudo o teor de compostos fenólicos diminuiu ainda mais nos extratos comerciais. Essa diminuição relacionada com os processos fisiológicos dos vegetais que propendem ao envelhecimento, quando uma planta avança de um estágio fenológico para outro (RASOOL et al., 2018).

As plantas representam fonte de vários medicamentos que apresentam um papel crucial para a saúde e reproduz uma importante fonte de metabólitos com atividade antimicrobiana. Estes agentes antimicrobianos muitas vezes estão em extratos complexos de plantas medicinais (ALEKSIC SABO; KNEZEVIC et al., 2019).

No presente estudo os extratos E1R1, E2R3 apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *B. cereus* e o extrato EAR1 frente ao *B. subtilis* e *P. aeruginosa* (Tabela 2). O mapa de calor (Figura 11) apresentou alta concentração da yiamolosite B (16), ácido láctico (26), ramnose (29) no extrato E1R1; alta concentração do ácido 2-ceto-L-glucônico (19), eritritol (21), glicose (23), ácido láctico (26), ramnose (29) no extrato E2R3; e alta concentração do notoginsenosídeo R10 (10), ácido glicérico (24), ramnose no extrato EAR1.

Não há trabalhos que avaliem a atividade antibacteriana da yiamolosite B. Entretanto outro trabalho utilizou a saponina extraída de cascas de quinoa, este metabólito apresentou CIM de 0,50 mg mL. Entretanto a diversidade de metabólitos do extrato E1R1 é um fator que não

favorece uma comparação com metabólitos isolados (DONG et al., 2020). O extrato aquoso do tubérculo *Cyclamen coum* Miller que contém saponinas glicosídicas, apresentou CIM de 0,05 mg mL frente ao *S. aureus*. Entretanto as bactérias utilizadas em ambos os estudos são distintas, a concentração do extrato e a CIM não é comparável com o presente estudo. Embora não exista relatórios consistentes, é possível que a estrutura química da saponina tenha permeabilidade celular atingindo as bactérias (SABOORA et al., 2019).

No presente estudo o mapa (Figura 11) apresentou alta concentração do ácido láctico (26) nos extratos E1R1 e E1R3. Em outro trabalho, hidrogéis com adição do ácido láctico foi eficaz contra quatro bactérias, com CIM variando entre 6,25 – 12,50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (MOREIRA et al., 2019). Não há estudos que evidenciem o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos contra as bactérias, mas alguns mostram que a interação dos ácidos orgânicos com a estrutura celular das bactérias gera danos (YANG et al., 2016).

No presente estudo o mapa de calor (Figura 11) apresentou alta concentração da ramnose (29) nos extratos E1R1, E2R3, EAR1. A ramnose também foi encontrada nos polissacarídeos do agrião, e a mucilagem apresentou CIM de 0,56 mg mL<sup>-1</sup> contra *S. aureus*. O valor de CIM deste trabalho é comparável com presente estudo. Entretanto, o perfil metabolômico das amostras avaliadas são distintas. O mecanismo de ação proposto para a atividade antimicrobiana do polissacarídeo, mostra que permeabilidade da membrana celular externa e interna atenua a produção de proteínas e impede a produção de ácidos nucleicos nas bactérias (ALKAHTANI et al., 2020).

No presente estudo o mapa de calor (Figura 11) apresentou alta concentração do ácido glicérico (24) no extrato EAR1. Em outro trabalho, atividade antimicrobiana das partes subterrâneas do extrato de *Polemonium caeruleum* L. contra *P. aeruginosa* com IC<sub>50</sub> de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e um dos compostos identificados foi o ácido glicérico. Este metabólito mostrou estar correlacionado com a atividade antimicrobiana no presente estudo (ŁASKA et al., 2019).

O glioblastoma é um tumor astrócitrário maligno primário mais letal do sistema nervoso central e representa aproximadamente 50% de todos os gliomas. As células tumorais, que derivam de glioblastoma são modelos alternativos confiáveis para pesquisas considerando resposta à agentes externos. (CHESLER et al., 2013; BRISMAR, 1995).

O extrato EAR1 influenciou a menor viabilidade celular das células de glioma C6, quando comparado aos demais extratos deste estudo. A análise de correlação identificou o ácido 2-ceto-L-glucônico (19) e a yiamolósido B (16) como os principais metabólitos correlacionados com a atividade citotóxica (Figura 26). Não há estudos que avaliaram a atividade citotóxica do

ácido 2-ceto-L-glucônico contra linhagens de células tumorais. Entretanto outros ácidos orgânicos foram identificados no extrato do cogumelo comestível, *Coprinopsis atramentaria*, e este extrato mostrou citotoxicidade para as linhas celulares (MCF-7 - adenocarcinoma de mama, NCI-H460 - carcinoma de pulmão de células não pequenas, HCT15 - carcinoma de cólon) (HELENO et al., 2014).

Os solventes influenciaram uma maior variação de ácidos graxos e derivados e de carboidratos e derivados do metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L. O mapa de calor exhibe que os extratos hexânicos apresentaram uma grande concentração de ácidos graxos. E estes extratos não apresentaram as maiores atividades biológicas, quando comparados com os outros extratos do presente estudo. Em contrapartida, os extratos em etanol e acetato de etila apresentaram uma alta concentração de carboidratos e derivados e outras classes químicas e apresentaram maiores atividades biológicas quando comparado com os extratos hexânicos, e estes não apresentaram alta concentração de ácidos graxos e derivados. Logo, a escolha dos solventes foi importante para extrair os metabólitos com maiores atividades biológicas.

Os extratos do estágio fenológico reprodutivo 1 apresentaram uma maior concentração de carboidratos e derivados no metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L., estes metabólitos estão mais concentrados nos extratos que apresentaram maiores atividades biológicas. Logo, os extratos do estágio fenológico reprodutivo 1 apresentaram um perfil metabolômico que influenciou a atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana.

Os extratos *in natura* apresentaram uma maior concentração de carboidratos e derivados no metaboloma de extratos do estigma de *Zea mays* L. A ramnose está em alta concentração em todos os extratos que apresentaram a atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana. Entretanto este metabólito está em uma concentração muito baixa em todas as amostras comerciais. Além disto, os extratos comerciais apresentaram uma maior concentração de ácidos graxos, quando comparados às amostras *in natura*.

## 7. CONCLUSÃO

Nesse estudo os extratos do estigma de *Zea mays* L. e seu produto comercial apresentaram atividade antioxidante, antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativa e antitumoral contra células C6. O extrato E1R1 apresentou maior atividade antioxidante quando comparado aos demais extratos deste estudo; o extrato EAR1 foi mais ativo na atividade citotóxica e antibacteriana. A partir da análise estatística foi possível observar que ácidos orgânicos, carboidratos e uma saponina são as classes químicas mais importantes

para as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. A utilização dos solventes, acetato de etila e etanol, influenciou o perfil metabolômico dos extratos, EAR1, E1R1 e E2R3, e estes apresentaram atividades biológicas superiores quando comparados com os extratos hexânicos. Os extratos no estágio fenológico reprodutivo 1 apresentaram perfil metabolômico importante para as atividades biológicas testadas neste estudo quando comparado estágio fenológico reprodutivo 2. Os extratos obtidos das amostras *in natura* apresentaram maiores atividades biológicas quando comparados com as amostras comerciais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S. et al. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. **Mediators of Inflammation**, 2003.

ABUBAKAR, I. B. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used for cancer treatment in Kebbi state, North-west Nigeria. **Acta Ecologica Sinica**, v. 40, n. 4, p. 306–314, 2020.

ABUDAWOOD, M. et al. Interrelationship between oxidative stress, DNA damage and cancer risk in diabetes (Type 2) in Riyadh, KSA. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 177–183, 2020.

ADAM, K. et al. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739–1745, 1998.

ADAMSKI, J. Introduction to metabolomics. **Metabolomics for Biomedical Research**, p. 1–15, 1 jan. 2020.

AGUIRRE, L. et al. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. **Open Nutraceuticals Journal**, v. 4, p. 189–198, 2011.

AHAMED, A. et al. Molecular perspective and anticancer activity of medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 666–675, 2020.

AHMED, H. H.; HAMZA, A. H.; KOTOB, S. E. Corn silk offers multimechanistic approaches in mitigating obesity in rodents. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 4, p. 292–298, 2016.

AHN, J. *et al.* The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, p. 545-549, 2008.

AKARCHARIYA, N. et al. Chemical profiling and antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma glans* K. Larsen & J. Mood and *Curcuma cf. xanthorrhiza* Roxb. collected in Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2017.

AKBARI, F.; DIDEHBAN, K.; FARHANG, M. Solubility of solid intermediate of pharmaceutical compounds in pure organic solvents using semi-empirical models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 143, p. 105209, 2020.

AKINPELU, D. A. et al. Stem bark extract and fraction of *Persea americana* (Mill.) exhibits bactericidal activities against strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 416–429, 2015.

ALARCÓN, L. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Ruilopezia bracteosa*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 655-656, 2015.

- ALBUQUERQUE, C. J. B. et al. Performance of experimental and commercial hybrids of maize for the production of green maize. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 768–775, 2008.
- ALEKSIC SABO, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. plant extracts and essential oils: A review **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 413-429, 2019.
- ALKAHTANI, J. et al. Anti-bacterial, anti-scavenging and cytotoxic activity of garden cress polysaccharides. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020.
- ALLEN, A.; WILLIAMS, M. R.; SIGMAN, M. E. Application of likelihood ratios and optimal decision thresholds in fire debris analysis based on a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) model. **Forensic Chemistry**, v. 16, 2019.
- ALVARADO-MARTINEZ, Z.; ADITYA, A.; BISWAS, D. Plant antioxidants, extraction strategies, and their application in meat. In: **Meat Quality Analysis: Advanced Evaluation Methods, Techniques, and Technologies**. [s.l: s.n.]. p. 241–264, 2019.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANAND, K. et al. Phytonanotherapy for management of diabetes using green synthesis nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 626-639, 2017.
- ANAND, U. et al. Investigation on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from the plant family of Apocynaceae; possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. **Drug Resistance Updates**, n. March, p. 100695, 2020.
- ANDERSON, E; BROWN, W. L. The history of the common maize varieties of the United States corn belt. **Agricultural History**, 1952.
- ANTABE, R.; ZIEGLER, B. R. **Diseases, Emerging and Infectious**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 3, p. 389 -391, 2020.
- ANTUNES-RICARDO, M. et al. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of antioxidant isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 158, 2020.
- ANYWAR, G. et al. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners to boost the immune system in people living with HIV/AIDS in Uganda. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 35, p. 101011, 2020.
- AOKI, H.; KUZE, N.; KATO, Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, v. 199, p. 41–45, 2002.
- ASSEFA, Y. et al. Corn and Grain Sorghum Morphology, Physiology, and Phenology. **Corn and Grain Sorghum Comparison**, p. 3–14, 2014.

AU-YEUNG, K. K. W. et al. Herbal isoprenols induce apoptosis in human colon cancer cells through transcriptional activation of PPAR $\gamma$ . **Cancer Investigation**, v. 26, n. 7, p. 708–717, 2008.

AYAZ, F. A. *et al.* Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8116–8122, 2005.

AZEVEDO, L. et al. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 852–858, 2007.

BABA, A. B. et al. Blueberry and malvidin inhibit cell cycle progression and induce mitochondrial-mediated apoptosis by abrogating the JAK/STAT-3 signalling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 534–543, 2017.

BAEK, K. S. *et al.* Comparison of anticancer activities of Korean red ginseng-derived fractions. **Journal of Ginseng Research**, V. 41, p. 386–391, 2017.

BAEK, K. S. *et al.* In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of Korean red Ginseng-derived components. **Journal of Ginseng Research**, V. 40, P. 437–444, 2016.

BAI, M. et al. Triterpenoids from *Picrasma quassioides* with their cytotoxic activities. **Phytochemistry Letters**, v. 39, p. 128–131, 2020.

BALLHORN, D. J. et al. Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

BATUBARA, I. et al. Effects of inhaled citronella oil and related compounds on rat body weight and brown adipose tissue sympathetic nerve. **Nutrients**, 2015.]

BEEBY, E. et al. Secondary metabolites (essential oils) from sand-dune plants induce cytotoxic effects in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, p. 112803, 2020.

BENDA, P. et al. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370–371, 1968.

BENJAMINI, YOAV ; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological 1995.pdf. **Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)**, 1995.

BERETTA, G. et al. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011.

BHATTACHARYA, A. High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants. **Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules**, p. 391–484, 2019.

BIJLSMA, S. et al. Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-)



processing and validation. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 567–574, 2006.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, 2015.

BJELAKOVIC, G. et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, p. 842-857, 2007.

BOCCARD, J.; RUDAZ, S. **Analysis of Metabolomics Data—A Chemometrics Perspective**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

BOEIRA, C. P. et al. Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* extract for application as natural antioxidant in fresh sausage. **Food Chemistry**, v. 319, 2020.

BORAH, P.; BANIK, B. K. Medicinal plants and their compounds with anticancer properties. **Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design**, p. 759-776, 2020.

BORS, W. *et al.* Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355 1990.

BOULAABA, M. et al. Biological activities and phytochemical analysis of phenolic extracts from *Salsola kali* L. Role of endogenous factors in the selection of the best plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 193–199, 2019.

BRISMAR, T. Physiology of transformed glial cells. **Glia**, v. 15, n. 3, p. 231–243, 1995.

BRITO, R. G. et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, 2012.

BRITO, R. G. et al. Citronellol, a natural acyclic monoterpene, attenuates mechanical hyperalgesia response in mice: Evidence of the spinal cord lamina I inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, 2015.

BROWN, B. A. et al. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005.

CAGNIN, S.; CHEMELLO, F.; AHMETOV, I. I. Genes and response to aerobic training. **Sports, Exercise, and Nutritional Genomics**, p. 169-188, 2019.

CALBET, J. A. L. et al. An integrative approach to the regulation of mitochondrial respiration during exercise: Focus on high-intensity exercise. **Redox Biology**, v. 35, p. 101478, 2020.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment. **American Association for Cancer Research**, v. 47, p. 936–942, 1987.

- CÁSEDAS, G. *et al.* Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, 2018.
- CEJUDO-BASTANTE, M. J. *et al.* Characterisation of commercial aromatised vinegars: Phenolic compounds, volatile composition and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1284–1302, 2013.
- CHAIITTIANAN, R. *et al.* Anti-obesity potential of corn silks: Relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 497–510, 2016.
- CHAIITTIANAN, R.; SUTTHANUT, K.; RATTANATHONGKOM, A. Purple corn silk: A potential anti-obesity agent with inhibition on adipogenesis and induction on lipolysis and apoptosis in adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 201, p. 9-16, 2017.
- CHANVORACHOTE, P. Potential Anti-metastasis Natural Compounds for Lung Cancer. **Anticancer Res**, v. 36, n. 11, p. 5707-5717, 2016.
- CHEN, S. *et al.* Chemical modification, antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 2013.
- CHEN, W. *et al.* Anti-tumor effect of  $\alpha$ -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2015.
- CHOI, D. J. *et al.* Neuroprotective effects of corn silk maysin via inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic cell death in SK-N-MC cells. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 57–64, 2014.
- CHOI, M. R. *et al.* Chronic saponin treatment attenuates damage to the pancreas in chronic alcohol-treated diabetic rats. **Journal of Ginseng Research**, v.41, p. 503-512, 2017.
- CHOLEWA, J. M.; NEWMIRE, D. E.; ZANCHI, N. E. Carbohydrate restriction: Friend or foe of resistance-based exercise performance? **Nutrition**, v. 60, p. 136-146, 2019.
- CICHOZ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseasesWorld. **Journal of Gastroenterology**, 2014.
- COELHO, R. C. L. A.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Anti-inflammatory Properties of Orange Juice: Possible Favorable Molecular and Metabolic Effects. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 1-10, 2013.
- COHEN, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 1988.
- COLE, L.; KRAMER, P. R. Bacteria, Virus, Fungi, and Infectious Diseases. **Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine**, p. 193–196, 2016.
- CUEVAS SÁNCHEZ, J. Evolución natural y antropogénica de Zea spp. en Mesoamérica. **Archaeobios**, n. 5, p. 36–78, 2011.
- CUSTÓDIO, D. L. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1363–1369, 2010.

- DAIBER, A.; CHLOPICKI, S. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. **Free Radical Biology and Medicine**, n. February, p. 1–23, 2020.
- DARRAH, L. L.; MCMULLEN, M. D.; ZUBER, M. S. Breeding, Genetics and Seed Corn Production. In: **Corn**. [s.l: s.n.]. p. 19–41, 2019.
- DE OLIVEIRA JÚNIOR, W. M. et al. Farnesol: Antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 419–426, 2013.
- DE SOUSA, D. P. et al. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, 2006.
- DE SOUZA, J. F. et al. Potential use of extract of the plant *Schwartzia brasiliensis* (choisy) bedell ex gir.-Cañas against the toxic effects of the venom of *Bothrops jararaca* or *B. jararacussu*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 125, 2020.
- DEEPPHA, V. *et al.* Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 737-745, 2014.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430–1435, 2011.
- DERAKHSHAN, S.; HOSSEINZADEH, A. Resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying virulence genes in hospitalized patients with urinary tract infection from Sanandaj, west of Iran. **Gene Reports**, v. 20, p. 100675, 2020.
- DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, 1994.
- DIKHOBABA, P. M. et al. Antifungal and anti-mycotoxigenic activity of selected South African medicinal plants species. **Heliyon**, v. 5, n. 10, 2019.
- DILSHAD, E. et al. Metabolite profiling of *Artemisia carvifolia* Buch transgenic plants and estimation of their anticancer and antidiabetic potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101539, 2020.
- DONG, S. et al. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 149, 2020.
- DONG, Y. et al. An underestimated pathogen: *Staphylococcus epidermidis* induces pro-inflammatory responses in human alveolar epithelial cells. **Cytokine**, v. 123, p. 154761, 2019.
- DUBEY, R. K. et al. Antioxidant potential and free radical scavenging activity of *Parkia roxburghii*, G. Don, a lesser known leguminous tree from North East India. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 454–461, 2020.

DUBREUIL, J. D. Fruit extracts to control pathogenic *Escherichia coli*: A sweet solution. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03410, 2020.

EBRAHIMZADEH, M. A.; POURMORAD, F.; HAFEZI, S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. **Turkish Journal of Biology**, v. 32, p. 43-49, 2008.

EKLÖF, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and risk of death and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an observational cohort study of 22 053 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 227–234, 2020.

ELFALLEH, W.; KIRKAN, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 212–216, 2019.

ELFAWY, H. A.; DAS, B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. **Life Sciences**, p. 165-184, 2019.

EL-GHORAB, A.; EL-MASSRY, K. F.; SHIBAMOTO, T. Chemical composition of the volatile extract and antioxidant activities of the volatile and nonvolatile extracts of Egyptian corn Silk (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9124–9127, 2007.

ELSA MADHU, S.; SREEJA, H.; PRIYA, J. S. A preliminary study on phytochemical, antioxidant and cytotoxic activity of leaves of *Naregamia alata* Wight & Arn. **Materials Today: Proceedings**, v. 25, p. 343–348, 2020.

ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: From analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports** v. 31, n. 6, p. 784-806, 2014.

FARIED, A. *et al.* Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 30, p. 605-613, 2007.

FAVOT, L. et al. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 59, n. 2, p. 479–487, 2003.

FAZILATUN NESSA, Z. I. AND N. M. Antimicrobial Activities of Extracts and Flavonoid Glycosides of Corn Silk (*Zea mays* L). **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, n. 8765, p. 115–121, 2012.

FERNANDES, S. et al. Catalase incorporation in freezing mixture leads to improved recovery of cryopreserved iPSC lines. **Cryobiology**, v. 90, p. 21–29, 2019.

FERNANDEZ, O. et al. Fortune telling: metabolic markers of plant performance. **Metabolomics**, v. 12, n. 10, 2016.

FERREIRA, K. P. Z. et al. Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 373, p. 236–241, 2017.

- Galinat, W.C., 1988. The origin of corn. In: Sprague, G.F., Dudley, J.W. (Eds.), *Corn and Corn Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1–31.
- GAO, S. et al. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108795, 2020.
- GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Corn history and culture. In: **Corn: Chemistry and Technology, 3rd Edition**. [s.l: s.n.]. p. 1–18, 2019.
- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, 2007.
- GIANNENAS, I. et al. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts. In: **Feed Additives**. [s.l: s.n.]. p. 1–18, 2020;.
- GINTING, B. et al. Lignan compound isolated from n-Hexane extract myristica fragrans Hoult root as antioxidant and antitumor activities against MCF-7 cell lines data. **Data in Brief**, v. 31, p. 105997, 2020.
- GÓMEZ-MARTÍNEZ, M. et al. Location and tissue effects on phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of *Moringa oleifera*. **Industrial Crops and Products**, v. 151, 2020.
- GONZALEZ-AUDINO, P. et al. Comparative toxicity of oxygenated monoterpenoids in experimental hydroalcoholic lotions to permethrin-resistant adult head lice. **Archives of Dermatological Research**, 2011.
- GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review **Pharmacological Research**, v. 64, p. 438-455, 2011.
- GOSWAMI, S. et al. Comparative antioxidant and antimicrobial potentials of leaf successive extract fractions of poison bulb, *Crinum asiaticum* L. **Industrial Crops and Products**, v. 154, 2020.
- GRAÇA, V. C. et al. Isolation of secondary metabolites from *Geranium molle* L. with anticancer potential. **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 111859, 2019.
- GRASES, F. et al. The influence of *Zea mays* on urinary risk factors for kidney stones in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 2, p. 146–149, 1993.
- GUADIE, A. et al. Antibacterial activity of selected medicinal plants used by traditional healers in Genta Meyche (Southern Ethiopia) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Herbal Medicine**, 2020.
- GULUMA, T. et al. Phytochemical Investigation and Evaluation of Antimicrobial Activities of *Brucea antidysenterica* Leaves. **Chemical Data Collections**, v. 28, p. 100433, 2020.
- GUNATHILAKE, K. D. P. P.; RANAWEERA, K. K. D. S.; RUPASINGHE, H. P. V. Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated

gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. **Food Chemistry**, v. 245, p. 371–379, 2018.

GUO, B. Z. et al. Lost P1 Allele in sh2 Sweet Corn: Quantitative Effects of p1 and a1 Genes on Concentrations of Maysin, Apimaysin, Methoxymaysin, and Chlorogenic Acid in Maize Silk. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 6, p. 2117–2126, 2004.

GUO, J. et al. The effects of corn silk on glycaemic metabolism. **Nutrition and Metabolism**, v. 6, 2009.

GUO, Q. et al. Hypoglycemic effects of polysaccharides from corn silk (*Maydis stigma*) and their beneficial roles via regulating the PI3K/Akt signaling pathway in L6 skeletal muscle myotubes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, p. 905-961, 2015

HABTEMARIAM, S. Extract of corn silk (*stigma of Zea mays*) inhibits the tumour necrosis factor- $\alpha$ - and bacterial lipopolysaccharide-induced cell adhesion and ICAM-1 expression. **Planta Medica**, 1998.

HAIR, J. F. et al. Partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM): An emerging tool in business research. **European Business Review**, v. 26, n. 2, p. 106–121, 2014.

HAN, Y. H. et al. Peroxiredoxin I deficiency increases keratinocyte apoptosis in a skin tumor model via the ROS-p38 MAPK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 529, n. 3, p. 635–641, 2020.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 203–210, 1989.

HAO, D.-C. Anticancer Chemodiversity of Ranunculaceae Medicinal Plants. **Ranunculales Medicinal Plants**, 2019.

HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, n. 4 49-4, 2001.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: **A mechanistic view Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, n.1, p. 177-188, 1996.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 111-129, 2015.

HAZRA, A. et al. MIPS: Functional dynamics in evolutionary pathways of plant kingdom. **Genomics**, v. 111, n. 6, p. 1929–1945, 2019.

HELENO, S. A. et al. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. **Food Research International**, v. 55, p. 170–175, 2014.

- HIM, A. et al. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. **Pharmacologyonline**, 2008.
- HISAJIMA, T. et al. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 7, p. 237–333, 2008.
- HOFFMAN, J. I. E. Analysis of Variance. I. One-Way. **Basic Biostatistics for Medical and Biomedical Practitioners**, p. 391–417, 2019.
- HONG, E.-J. et al. Antibacterial and Antifungal Effects of Essential Oils from Coniferous Trees. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 2004.
- HU, Q.-L. et al. Purification and anti-fatigue activity of flavonoids from corn silk. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 321–326, 2010.
- HUANG, Q. et al. Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK: Anti-diabetic effect of phenolic compounds in HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 487–494, 2015.
- HUANG, W. Y. et al. Inhibitory effect of Malvidin on TNF- $\alpha$ -induced inflammatory response in endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, n. 1, p. 67–72, 2014.
- HUANG, X. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of active ingredients in the essential oils from *Gynura procumbens*, a traditional medicine and a new and popular food material. **Journal of Ethnopharmacology**, 2019.
- HUANG, Y. et al. Effects of (-)-Epigallocatechin gallate on some protein factors involved in the epidermal growth factor receptor signaling pathway. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 5, p. 293–299, 2009.
- HUANG, Y.; FLINT, S. H.; PALMER, J. S. *Bacillus cereus* spores and toxins – The potential role of biofilms. **Food Microbiology**, v. 90, p. 103493, 2020.
- JAGANATHAN, S. K. et al. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**, 2010.
- JAIME, L. et al. Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea* L.) using liquid solvent and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 722–729, 2015.
- JAISWAL, R. *et al.* Does roasted coffee contain chlorogenic acid lactones or/and cinnamoylshikimate esters? **Food Research International**, v. 61, p. 214-227, 2014a.
- JAISWAL, R. *et al.* Identification and characterisation of the phenolics of *Ilex glabra* L. Gray (*Aquifoliaceae*) leaves by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 106, p. 141-155, 2014b.
- JAISWAL, R.; DESHPANDE, S.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of *rudbeckia hirta*, *helianthus tuberosus*, *carlina acaulis* and *symphyotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSn. **Phytochemical Analysis**, 2011b.

- JAISWAL, R.; KIPROTICH, J.; KUHNERT, N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. **Phytochemistry**, v. 72, p. 781-790, 2011a.
- JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 26-38, 2018.
- JEONG, M.-H. et al. Delphinidin induces apoptosis via cleaved HDAC3-mediated p53 acetylation and oligomerization in prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, 2016.
- JIMÉNEZ, A. et al. The biological activity of the wine anthocyanins delphinidin and petunidin is mediated through Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 7, p. 858–869, 2010.
- JIN, L. *et al.* Naringenin Ameliorates Acute Inflammation by Regulating Intracellular Cytokine Degradation. **The Journal of Immunology**, v. 199, p. 3466-3477, 2017.
- JIN, M. et al. Solasonine promotes ferroptosis of hepatoma carcinoma cells via glutathione peroxidase 4-induced destruction of the glutathione redox system. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 129, n. May, p. 110282, 2020.
- JÓZWIAK, M. et al. Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 871, 2020.
- JUN, Y. C. et al. Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. **Pest Management Science**, v. 63, n. 9, p. 935–940, 2007.
- JUNSATHIAN, P. et al. Biological and neuroprotective activity of Thai edible plant extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 548–554, 2018.
- KADRI, A; ZARAI, Z. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. **Journal of Medicinal Plants Research**, 2011.
- KALTBACH, P. et al. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103568, 2020.
- KAN, A. et al. In-vitro neuroprotective properties of the *Maydis stigma* extracts from four corn varieties. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 1–4, 2012.
- KANDI, S.; CHARLES, A. L. Statistical comparative study between the conventional DPPH [rad] spectrophotometric and dropping DPPH [rad] analytical method without spectrophotometer: Evaluation for the advancement of antioxidant activity analysis. **Food Chemistry**, v. 287, p. 338–345, 2019.
- KIM, D.-S. et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity Through the Suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. **The American Journal of Chinese Medicine**, 2015.



- KIM, H et al. Anti-inflammatory and anti-atopic effects of corn silk (*Zea mays* L.) ethanol extracts. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 710-713, 2017.
- KIM, H. et al. (-) Epigallocatechin gallate suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through transcription factors FoxO1 and SREBP1c. **Cytotechnology**, v. 62, n. 3, p. 245–255, 2010.
- KNEZEVIC, P. et al. A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 271–278, 2018.
- KOBAYASHI, Y. et al. Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2016.
- KOEK, M. M. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. **Metabolomics**, 2011.
- KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, 2007.
- KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: Resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Reviews**, 2013.
- KUMAR, V.; TYAGI, D. Chemical composition and biological activities of essential oils of genus *Tanacetum* - a review. **Section Title: Plant Biochemistry**, v. 2, n. 3, p. 159–163, 2013.
- LALITHA, L. J. et al. In-vitro phytopharmacological and anticancer activity of *Loranthus Longiflorus* Desv. Var. *Falcatuskurz* against the human lung cancer cells. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1246–1253, 2020.
- ŁASKA, G. et al. Phytochemistry and biological activities of *Polemonium caeruleum* L. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 314–323, 2019.
- LAZOU, M. et al. Transition metal complexes with a novel guanine-based (E)-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)quinazolin-4(3H)-one: Synthesis, characterization, interaction with DNA and albumins and antioxidant activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 206, p. 111019, 2020.
- LEE, C. W. et al. Corn silk maysin ameliorates obesity in vitro and in vivo via suppression of lipogenesis, differentiation, and function of adipocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.
- LEE, E. A. et al. Genetic mechanisms underlying apimaysin and maysin synthesis and corn earworm antibiosis in maize (*Zea mays* L.). **Genetics**, v. 149, n. 4, p. 1997–2006, 1998.
- LEE, J. et al. Corn silk maysin induces apoptotic cell death in PC-3 prostate cancer cells by mitochondrial-dependent pathway. **Life Sciences**, v. 119, p. 47-55, 2014.

- LEE, J. H. et al. Farnesol inhibits tumor growth and enhances the anticancer effects of bortezomib in multiple myeloma xenograft mouse model through the modulation of STAT3 signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 360, n. 2, p. 280–293, 2015.
- LETSIDIDI, K. S. et al. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. **Lwt**, v. 94, p. 25–32, 2018.
- LEVENSON, A. S. Metastasis-associated protein 1-mediated antitumor and anticancer activity of dietary stilbenes for prostate cancer chemoprevention and therapy. ‘1q2’ **Seminars in Cancer Biology**, 2020.
- LI, Y. et al. Characterization of a polysaccharide with antioxidant and anti-cervical cancer potentials from the corn silk cultivated in Jilin province. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 80-89, 2020.
- LIU, P. et al. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. **Mycologia**, v. 102, n. 2, p. 311–318, 2010.
- LIU, W. J. et al. Notoginsenoside R1 attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 314–320, 2010.
- LIU, R. *et al.* In Vivo Detection of Secondary Metabolites☆. *In: REFERENCE MODULE IN CHEMISTRY, MOLECULAR SCIENCES AND CHEMICAL ENGINEERING.* [S. l.]: Elsevier, 2016.
- LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 31-59, 2009.
- LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, p. 803–820 2016.
- LU, B. et al. Industrial PLS model variable selection using moving window variable importance in projection. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 135, p. 90–109, 2014.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Circular Técnica 76 - Fisiologia da Produção de Milho. **Circulares Técnicas Embrapa**, v. d, p. 10, 2006.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. Fisiologia da planta de milho. **Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS**, n. 20, p. 1- 29, 1995.
- MAHAJAN, M.; KUIRY, R.; PAL, P. K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 100255, 2020.
- MAHENDRA, C. et al. Biopotentiality of leaf and leaf derived callus extracts of *Salacia macrosperma* Wight. — An endangered medicinal plant of Western Ghats. **Industrial Crops and Products**, v. 143, 2020.

- MAJOLO, F. et al. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 196–207, 2019.
- MANILAL, A. et al. In vitro antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. **Heliyon**, v. 6, n. 1, 2020.
- MANZONI, C. et al. Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 286–302, 2018.
- MAREMONTI, E. et al. In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, n. September 2019, p. 583–596, 2020.
- MARKO, D. et al. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, n. 4, p. 318–325, 2004.
- MASELLA, R. *et al.* Protocatechuic Acid and Human Disease Prevention: Biological Activities and Molecular Mechanisms. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 2901-2917, 2012.
- MATKOVICS, B. et al. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, 1977.
- MATSUNAGA, N. et al. Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage in vitro and in vivo. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 7, p. 869–877, 2009.
- MAURYA, I. K.; SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K. **Combination therapy against human infections caused by *Candida* species**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.
- MCINTYRE, M. British herbal compendium. Vol 1: A handbook of scientific information on widely used plant drugs. (Companion to Vol 1 of the British Herbal Pharmacopoeia). **Complementary Therapies in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 226–227, 1993.
- MEHMOOD, T. et al. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, p. 62-69, 2012.
- MEZZA, G. N. et al. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. **Food Chemistry**, 2018.
- MICHAELAKIS, A. et al. Bioefficacy of acyclic monoterpenes and their saturated derivatives against the West Nile vector *Culex pipiens*. **Chemosphere**, 2014.
- MIRNEZAMI, R. et al. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 1, p. 39–49, 2014.

MIRONĆZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 1972.

MOCCIARO, G. et al. Dietary absorption profile, bioavailability of (poly)phenolic compounds, and acute modulation of vascular/endothelial function by hazelnut skin drink. **Journal of Functional Foods**, v. 63, p. 103576, 2019.

MORENO, A.; LUCIO-HERNÁNDEZ, D.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Biosynthesis of chemical compounds by *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 3, p. 120–128, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

MULYANINGSIH, S. et al. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 9, p. 893–899, 2011.

NADI, Z. R. et al. Evaluation of antibiotic resistance and prevalence of common *Salmonella enterica* serovars isolated from foodborne outbreaks. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104660, 2020.

NARITA, Y. *et al.* Inhibitory Activity of Chlorogenic Acids in Decaffeinated Green Coffee Beans against Porcine Pancreas Lipase and Effect of a Decaffeinated Green Coffee Bean Extract on an Emulsion of Olive Oil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 12, p. 2329–2331, 2012.

NARVÁEZ-CUENCA, C. E.; VINCKEN, J. P.; GRUPPEN, H. Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC-DAD-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 130, p. 730–738, 2012.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NISSEN, L. et al. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). **Fitoterapia**, 2010.

NODA, Y. et al. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 166–171, 2002.

- NURHANAN, A. R.; WAN ROSLI, W. I.; MOHSIN, S. S. J. Total polyphenol content and free radical scavenging activity of cornsilk (*Zea mays* hairs). **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 10, p. 1217–1221, 2012.
- NWACHUKWU, U. et al. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal. **Scientific African**, v. 6, 2019.
- OBOH, G.; RADDATZ, H.; HENLE, T. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2486–2492, 2008.
- OCHWANG'I, D. O. et al. Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 233–240, 2018.
- OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; FASINU, P. S. Antimicrobial and antiprotozoal activities of twenty-four Nigerian medicinal plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 240–246, 2018.
- OLIVEIRA, Y. P. A. DE et al. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 19–26, 2017.
- OLMEDO, R.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. **Food Chemistry**, 2014.
- OMORUYI, F. et al. Superoxide dismutase as a measure of antioxidant status and its application to diabetes. **Diabetes**, p. 409-417, 2020.
- ORTON, T. J. Breeding Methods for Outcrossing Plant Species: II. Hybrid Cultivars. **Horticultural Plant Breeding**, p. 287–307, 2020.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. **Neuro-Oncology**, 2019.
- OURABAH, A. et al. Anti-*Candida albicans* biofilm activity of extracts from two selected indigenous Algerian plants: *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia*. **Journal of Herbal Medicine**, v. 20, p. 100319, 2020.
- OWOYELE, B. V. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Aqueous Extract of *Zea mays* Husk in Male Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, 2010.
- PAN, S. Y. et al. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.
- PAN, Y. et al. Physicochemical properties and antidiabetic effects of a polysaccharide from corn silk in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

PARASTAR, H.; TAULER, R. Multivariate curve resolution of hyphenated and multidimensional chromatographic measurements: A new insight to address current chromatographic challenges. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 286–297, 2014.

PAREDES-GONZALEZ, X. *et al.* Apigenin Reactivates Nrf2 Anti-oxidative Stress Signaling in Mouse Skin Epidermal JB6 P + Cells Through Epigenetics Modifications. **The AAPS Journal**, v. 16, p. 727-735, 2014.

PARK, H. J. *et al.* Centipede grass exerts anti-adipogenic activity through inhibition of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma expression and the AKT signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 230, 2012.

PARK, S. Y.; BAE, J. H.; OH, M. M. Manipulating light quality to promote shoot growth and bioactive compound biosynthesis of *Crepidiastrum denticulatum* (Houtt.) Pak & Kawano cultivated in plant factories. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 16, 2020.

PASCUAL - TERESA, S ; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1003-1006, 2002.

PASCUAL-TERESA, FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, p. 21-54, 2000.

PASSOS, M. DE S. *et al.* Terpenoids isolated from *Azadirachta indica* roots and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 1, p. 40–45, 2019.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 956–963, 2007.

PEREIRA, L. S. A. *et al.* Screening method for rapid classification of psychoactive substances in illicit tablets using mid infrared spectroscopy and PLS-DA. **Forensic Science International**, v. 288, p. 227–235, 2018.

PERO, R.; LUND, H.; LEANDERSON, H. Antioxidant metabolism induced by quinic acid, increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytother Research**, v. 23, p. 335-346, 2009;

PEZZATTI, J. *et al.* Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 2020.

PHAM, H. N. T. *et al.* Screening phytochemical content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don stem extract and its fractions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 405–411, 2018.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1035-1042, 2000.

PINHEIRO, A. C. S. et al. Efeito do extrato aquoso de cabelo de milho (*Zea mays* L.) sobre a excreção renal de água e eletrólitos e pressão arterial em ratos wistar anestesiados. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n. 4, p. 375–381, 2011.

PINHEIRO, M. A. et al. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, 2015.

QUIROGA, P. R.; GROSSO, N. R.; NEPOTE, V. Antioxidant effect of poleo and oregano essential oil on roasted sunflower seeds. **Journal of Food Science**, 2013.

RAGHURAM, A., CASTRO-CHAVES, C.O. *Zea mays* L. foi a planta mais citada mundialmente como diurética na análise retrospectiva de 147 anos em 93 livros de fitoterapia. *Anais do XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil Recife*, p. 272, 2000.

RAJABPOOR, S.; GHADERIAN, S. M.; SCHAT, H. Antimony tolerance and accumulation in a metallicolous and a non-metallicolous population of *Salvia spinosa* L. **Plant and Soil**, v. 437, n. 1–2, p. 11–20, 2019.

RAMEZANI, H. Fungicidal activity of volatile oil from eucalyptus *Citriodora* Hook. against *Alternaria triticina*. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, 2006.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105–112, 2014.

RASOOL, S. et al. Abiotic stress and plant senescence. In: SARWAT, M.; TUTEJA, N. B. T.-S. S. AND C. IN P. (Eds.). . **Senescence Signalling and Control in Plants**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 15–27.

RATHER, M. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. **Phytomedicine**, 2012.

REN, S. C.; QIAO, Q. Q.; DING, X. L. Antioxidative activity of five flavones glycosides from corn silk (*Stigma maydis*). **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 2, p. 148–155, 2013.

REN, S. Two C-Glycoside Flavones From Corn (*Zea Mays*) Silk. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 4, p. 27, 2018.

REN, S.-C.; LIU, Z.-L.; DING, X.-L. Isolation and identification of two novel flavone glycosides from corn silk (*Stigma maydis*). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 12, p. 1009–1015, 2009.

REZENDE, W. S. et al. Performance and yield stability of maize hybrids in stress-prone environments in eastern Africa. **Crop Journal**, v. 8, n. 1, p. 107–118, 2020.

RIBEIRO, L. P.; SANTOS, D. M. B.; LIMA NETO, I. de A.; BARBOSA, M. F.; CUNHA, T. J. F. Levantamento detalhado dos solos, capacidade de uso e classificação de terras para

irrigação da Estação de Plasticultura da Universidade Federal da Bahia/Politeno em Cruz das Almas-BA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, n.1, p.105-113, 1995.

RIOS, E. R. V. et al. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 3, p. 573–579, 2013.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, 1989. 21 p. (Special Report n. 48).

RODRIGUES, K. A. D. F. et al. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

ROJAS, J.; BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

ROTH-WALTER, F. et al. Immune suppressive effect of cinnamaldehyde due to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in immune cells: Implications in cancer. **PLoS ONE**, 2014.

ROUMY, V. et al. Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 2020.

ROY, M.; SEN, S.; CHAKRABORTI, A. S. Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. **Life Sciences**, v. 82, p. 1102-1110, 2008.

SABOORA, A. et al. Antibacterial activity of different composition of aglycone and glycosidic saponins from tuber of Cyclamen coum Miller. **Industrial Crops and Products**, v. 140, 2019.

SAFE, S.; KASIAPPAN, R. Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 11, p. 1723-1732, 2016.

SAKURAI, N. et al. (-)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation. **Nutrition**, v. 25, n. 10, p. 1047–1056, 2009.

SANNASIMUTHU, A. et al. Design and characterization of a novel Arthrospira platensis glutathione oxido-reductase-derived antioxidant peptide GM15 and its potent anti-cancer activity via caspase-9 mediated apoptosis in oral cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, p. 198–209, 2019.

SANTOS, B. L. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 123–138, 2015.

SANTOS, P. L. et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of Cymbopogon species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, 2016.



- SANTOS, P. M. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 834–844, 2018.
- SANTOS, R. L. V. DOS et al. Rendimento do híbrido de milho (*Zea mays* L.) AG 1051 sob diferentes populações de plantas em irrigação deficitária por gotejamento no Agreste Alagoano. **Revista Ambientale**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2020.
- SAREPOUA, E. et al. Influence of variety and harvest maturity on phytochemical content in corn silk. **Food Chemistry**, v. 169, p. 424–429, 2015.
- SARIKURKCU, C. et al. *Onosma pulchra*: Phytochemical composition, antioxidant, skin-whitening and anti-diabetic activity. **Industrial Crops and Products**, v. 154, 2020.
- SAROJ, A. et al. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. **Industrial Crops and Products**, 2015.
- SASHIDA, Y. Steroidal glycosides from Liliaceae plants and their biological activities. **Studies in Plant Science**, v. 6, n. C, p. 201–211, 1999.
- SATOH, M. et al. In vitro evaluation of minimum inhibitory concentration of several antibacterial agents against *Rickettsia japonica* using a plaque reduction assay system. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2019.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, 2009.
- SEMENTES AGROCERES. Sementes de milho: AG 1051. Boletim técnico online, 2012. Disponível em: Acesso em: 20 de março de 2020.
- Serna-Saldivar, S.O., 2015. History of corn and wheat tortillas. In: Rooney, L.W., Serna Saldivar, S.O. (Eds.), *Tortillas: Wheat Flour and Corn Products*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, pp. 1–28.
- SETHI, S. et al. **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. [s.l: s.n.]. v. 965, 2017.
- SHANG, Y. et al. Ceruloplasmin suppresses ferroptosis by regulating iron homeostasis in hepatocellular carcinoma cells. **Cellular Signalling**, v. 72, p. 109633, 2020.
- SHEN, K.-H.; CHEN, Z.-T.; DUH, P.-D. Cytotoxic Effect of *Eucalyptus citriodora* Resin on Human Hepatoma HepG2 Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 40, n. 02, p. 399–413, 2012.
- SIDOROVA, T. M. et al. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 4–10, 2020.
- SIHEM, T. et al. Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the Saharan plant *Oudneya africana*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 176, p. 104099, 2020.

- SILVA, L. L. et al. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 9, p. 771–779, 2013.
- SINGH, A. et al. Anticancer activity of gallic acid template-based benzylidene indanone derivative as microtubule destabilizer. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 88, p. 625–634, 2016.
- SINGH, J. C. H. et al. Cognitive effects of vanillic acid against streptozotocin-induced neurodegeneration in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 630–636, 2015.
- SINGH, R. K.; DHIMAN, R. C.; MITTAL, P. K. Studies on mosquito larvicidal properties of *Wucalyptus citriodora hook* (family-myrtaceae). **Journal of Communicable Diseases**, v. 39, n. 4, p. 233–236, 2007.
- SIRIPORN, P.; MAYURA, S. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Tropical biomedicine**, v. 29, n. 1, p. 138–50, 2012.
- SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.
- SLISZ, A. M. et al. Metabolomics analysis of citrus infection by “*Candidatus Liberibacter*” reveals insight into pathogenicity. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 4223–4230, 2012
- SNOOK, M. E. et al. Levels of Maysin and Maysin Analogues in Silks of Maize Germplasm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1481–1485, 1993.
- SOFOWORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : **AJT CAM / African Networks on Ethnomedicines**, 2013.
- SOLIHAN, M. A. et al. Aqueous extract of cornsilk confers mild diuretic activity in normal rats. **Sains Malaysiana**, v. 44, n. 8, p. 1167–1174, 2015.
- SOLÍS, C. et al. Antibacterial and antifungal terpenes from *pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 49, n. 2, p. 157–161, 2004.
- SOSA, A. et al. Flavonoides y saponinas de estilos y estigmas de *Zea mays* L. (Gramineae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 16, n. 4, p. 215–218, 1997.
- SRINIVASAN, S.; MURUGANATHAN, U. Antidiabetic efficacy of citronellol, a citrus monoterpene by ameliorating the hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, 2016.
- SRIVASTAV, V. K.; EGBUNA, C.; TIWARI, M. Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs. **Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery**, p. 3–14, 2020.

**STUMPF, P;** MUDD, J; **NES, W.** Multiple Roles for Plant Sterols, in: P.K. Stumpf, J.B. Mudd, W.D. Nes (Eds.) *The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids*, Springer New York, Boston, MA, p. 3-9, 1987.

SUÁREZ, M. E. Medicines in the forest: Ethnobotany of wild medicinal plants in the pharmacopeia of the Wichí people of Salta province (Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 525–544, 2019.

SULTANA, N. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation. **Steroids**, v. 136, p. 76-92, 2018.

SUN, H. et al. Antioxidant and prebiotic activity of five peonidin-based anthocyanins extracted from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

SUVÀ, M. L.; TIROSH, I. The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. **Cancer Cell**, p. 630-636, 2020.

SYTAŘOVÁ, I. et al. Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.

SZABO, M. R. et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**, v. 61, n. 3, p. 214–216, 2007.

SZYMAŃSKA, E. et al. Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, p. 3–16, 2012.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51–88, 2019.

TAN, M. et al. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. **Natural Product Research**, v. 22, n. 7, p. 569–575, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, p. 448-459, 2001.

THAKUR, M. et al. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 1-12, 2019.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatographic methods combined with mass spectrometry in metabolomics. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 7–16, 2012.

THOMPSON, R.Q., 2005. Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition (Worsfold, Paul; Tonshend, Alan; Poole, Colin), in: *Journal of Chemical Education*. Division of Chemical Education, p. 1313. <https://doi.org/10.1021/ed082p1313.2>

TIAN, J. *et al.* Comparative studies on the constituents, antioxidant and anticancer activities of extracts from different varieties of corn silk. **Food and Function**, 2013.

TLILI, N.; SARIKURKCU, C. Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, 2020.

TORAMAN, H. E. *et al.* Potential of genetically engineered hybrid poplar for pyrolytic production of bio-based phenolic compounds. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 229–236, 2016.

TOUKACH, F. V.; ANANIKOV, V. P. Recent advances in computational predictions of NMR parameters for the structure elucidation of carbohydrates: Methods and limitations. **Chemical Society Reviews**, p. 8376-8415, 2013.

TRESSERRA-RIMBAU, A.; ARRANZ, S.; VALLVERDU-QUERALT, A. New insights into the benefits of polyphenols in chronic diseases oxidative **Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

TREVIZAN, L. N. F. *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and anti-Mycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 510–515, 2016.

TSUDA, T. *et al.* Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. May, p. 2125–2130, 2003.

TUŠEK, A. J. *et al.* Application of multivariate regression and artificial neural network modelling for prediction of physical and chemical properties of medicinal plants aqueous extracts. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 16, n. May 2019, p. 100229, 2020.

TWILLEY, D. *et al.* Evaluation of traditionally used medicinal plants for anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and anti-viral (HPV-1) activity. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 494–500, 2017.

UKWUBILE, C. A. *et al.* Cytotoxic effects of new bioactive compounds isolated from a Nigerian anticancer plant *Melastomastrum capitatum* Fern. leaf extract. **Scientific African**, v. 8, p. e00421, 2020.

ULLAH, R. *et al.* A review on ethno-medicinal plants used in traditional medicine in the Kingdom of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020.

UMEZU, T. *et al.* Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. **Life Sciences**, 2002.

VALCOURT, C. *et al.* Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. **International Journal of Pharmaceutics**, 2016.

VALENTE, J. et al. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, 2013.

VANEGAS, J. M. et al. Staphylococcus aureus colonization increases the risk of bacteremia in hemodialysis patients: a molecular epidemiology approach with time-dependent analysis. **American Journal of Infection Control**, 2020.

VANHECKE, C. et al. Retrospective study of pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in Reunion. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 7, p. 534–539, 2019.

VANLERBERGHE, G. C. et al. Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase. **Mitochondrion**, v. 52, p. 197–211, 2020.

VARGO, M. et al. Apigenase-induced apoptosis is mediated by the activation of PKC $\delta$  and caspases in leukemia cells. **Pharmacology Biochemistry**, v. 72, p. 681–692, 2006.

VEIGA, A. et al. Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50–61, 2019.

VELAZQUEZ, D. V. O. et al. Zea mays L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 363–369, 2005.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and  $\beta$ -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790–S2795, 2017.

VILA, J. et al. Escherichia coli: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

VILLAS-BÔAS, S. G.; BRUHEIM, P. The Potential of Metabolomics Tools in Bioremediation Studies. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 3, p. 305–313, 2007.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J. P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, 1994.

VRANJEŠ, M. et al. Effects of bearberry, parsley and corn silk extracts on diuresis, electrolytes composition, antioxidant capacity and histopathological features in mice kidneys. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 272–282, 2016.

WAISS, A. C. J. et al. Maysin, a flavone glycoside from corn silks with antibiotic activity toward corn earworm. **J. Econ. Entomol.**, v. 72, p. 256–258, 1979.

WANG, C. et al. Subchronic toxicity study of corn silk with rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 36–43, 2011.

WANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHEN, C. Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008.

- WANG, G. et al. Identification of and antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas putida* from rot fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. **Scientia Horticulturae**, 2016.
- WANG, G. Q. et al. Anti-inflammation effects of corn silk in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. **Inflammation**, 2012.
- WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of hamamelitannin, catechins and gallic acid in witch hazel bark, twig and leaf by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 539-534, 2003.
- WANG, J. et al. Joint optimization of irrigation and planting pattern to guarantee seed quality, maximize yield, and save water in hybrid maize seed production. **European Journal of Agronomy**, v. 113, 2020.
- WANG, K. J.; ZHAO, J. L. Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, p. 510–517, 2019.
- WANG, R. et al. Aporphine and phenanthrene alkaloids with antioxidant activity from the roots of *Stephania tetrandra*. **Fitoterapia**, v. 143, 2020.
- WANG., W. et al. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, 2012.
- WECKWERTH, W.; KAHL, G. **The Handbook of Plant Metabolomics**. [s.l: s.n.], 2013.
- WELI, A. M. et al. Effect of different polarities leaves crude extracts of Omani juniperus excels on antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and their biochemical screening. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 2014.
- WIDSTROM, N. W.; SNOOK, M. E. A gene controlling biosynthesis of isoorientin, a compound in corn silks antibiotic to the corn earworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 89, n. 2, p. 119–124, 1998.
- WIDSTROM, N. W.; SNOOK, M. E. Recurrent selection for maysin, a compound in maize silks, antibiotic to earworm. **Plant Breeding**, v. 120, n. 4, p. 357–359, 2001.
- World Health Organization. Details of the factsheet, Cancer. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Accessed June 20, 2020.
- World Health Organization. Details of the factsheet, Cancer. Available at: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>. Accessed June 20, 2020.
- WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2012.
- WU, Y. *et al.* Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness via regulation of miR-21 and PTEN. **Food and Function**, 2017.

- XIE, D. et al. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble lignin-carbohydrate complexes (LCCs) isolated from wheat straw. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 315–324, 2020.
- XU, X. H. et al. Saponins from chinese medicines as anticancer agents. **Molecules**, v.21, n. 10, 2016.
- YANG, L. et al. Mechanism of enhanced antibacterial activity of ultra-fine ZnO in phosphate buffer solution with various organic acids. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 863–869, 2016.
- YANG, X. N.; KHAN, I.; KANG, S. C. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of *Forsythia koreana* deciduous shrub. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2015.
- YANG, X. Y. et al. Lignans and diterpenes isolated from *Tirpitzia ovoidea* and their biological activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 12, p. 938–943, 2017.
- YU et al. Analysis of Flavonoid Composition from Corn Silk with Thin Layer Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry. **Food Sci.** v. 29, p. 477 – 481, 2008
- YU, T. et al. Ginsenoside Rc from *Panax ginseng* exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2. **Journal of Ginseng Research**, v. 41, p. 127-133, 2017.
- ZAHABI, Z. F. et al. Antifungal activities of different fractions of *Salvia rhytidea* Benth as a valuable medicinal plant against different *Candida* species in Kerman province (Southeast of Iran). **Gene Reports**, v. 19, 2020.
- ZAHN, R. et al. Use of herbal medicines: Pilot survey of UK users' views. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 44, p. 83–90, 2019.
- ZAMUDIO, R. et al. Phylogenetic analysis of resistance to ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam and carbapenems in piperacillin/tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 6, p. 774–780, 2019.
- ZHAN, L. et al. The correlation of drug resistance and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biosafety and Health**, v. 2, n. 1, p. 18–24, 2020.
- ZHANG, H. L. et al. Secondary metabolites from *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo and their anticancer activity as DNA topoisomerase IB and Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 11, 2020.
- ZHANG, J. et al. Racial disparities, cancer and response to oxidative stress. In: **Advances in Cancer Research**. [s.l: s.n.]. v. 144p. 343–383, 2019.
- ZHANG, L.; HATZAKIS, E.; PATTERSON, A.D. NMR-Based Metabolomics and Its Application in Drug Metabolism and Cancer Research. **Current Pharmacology Reports**, v. 2, n. 5, 2016.

ZHANG, R. et al. Ethnopharmacology of Hypericum species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, p. 112686, 2020a.

ZHANG, Z. et al. Contribution of the serine protease HtrA in Escherichia coli to infection in foxes. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, 2019.

ZHANG, Z.-B. et al. Evaluation of the effects of androgenic Chinese herbal medicines on androgen receptors and tumor growth in experimental prostate cancer models. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020.

ZHAO, H. PENG et al. Acute toxicity and anti-fatigue activity of polysaccharide-rich extract from corn silk. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 90, p. 686–693, 2017.

ZHAO, Y. et al. Neuroprotective effects of Syringic acid against aluminium chloride induced oxidative stress mediated neuroinflammation in rat model of Alzheimer's disease. **Journal of Functional Foods**, v. 71, n. 324, p. 104009, 2020.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1–10, 2020.

ŽILIĆ, S. et al. Antioxidant activity, phenolic profile, chlorophyll and mineral matter content of corn silk (*Zea mays* L): Comparison with medicinal herbs. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 363–370, 2016.