



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOANDERSON PEREIRA CÂNDIDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NA
FARINHA DE ESTIGMA DE MILHO (*Zea mays* L.) COMO
PROPOSTA ALIMENTAR**

João Pessoa

2020

JOANDERSON PEREIRA CÂNDIDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NA
FARINHA DE ESTIGMA DE MILHO (*Zea mays* L.) COMO
PROPOSTA ALIMENTAR**

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586c Silva, Joanderson Pereira Cândido da.
Caracterização dos compostos presentes na farinha de estigma de milho (Zea mays L.) como proposta alimentar / Joanderson Pereira Cândido da Silva. - João Pessoa, 2020.
56 p. : il.

Orientação: Tatiane Santi Gadelha.
TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Estigma do milho. 2. Zea mays. 3. Farinha. I. Gadelha, Tatiane Santi. II. Título.

UFPB/CCEN CDU 57.013(043.2)

JOANDERSON PEREIRA CÂNDIDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NA
FARINHA DE ESTIGMA DE MILHO (*Zea mays* L.) COMO
PROPOSTA ALIMENTAR**

Monografia apresentada ao Curso
de Ciências Biológicas, como
requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas pela Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiane Santi Gadelha

JOÃO PESSOA

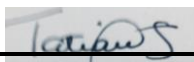
2020

JOANDERSON PEREIRA CÂNDIDO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NA FARINHA
DE ESTIGMA DE MILHO (*Zea mays* L.) COMO PROPOSTA
ALIMENTAR

Apresentada em: 17 de abril de 2020

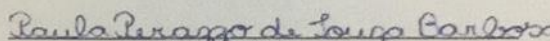
BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha – CCEN/UFPB
Orientadora e coordenadora da Banca Examinadora



Profa. Dra. Maria Eliedy Gomes de Oliveira – CCS/UFPB
Examinadora Interna



Dra. Paula Perazzo de Souza Barbosa
Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda as bênçãos e por possibilitar a realização dessa graduação com saúde e força de vontade.

O meu muitíssimo obrigado à professora Dra. Tatiane Santi Gadelha, por ser uma orientadora única, doando sua paciência, tempo, conhecimentos, além de inúmeros conselhos acadêmicos e para a vida. Também pela sua confiabilidade e credibilidade, sempre me lapidando para o meio acadêmico.

Aos meus pais Marilene, Jurandir, Sônia, Monteiro e aos meus irmãos em especial a Renata por todos os esforços e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha companheira Nathália, pelo suporte, amor, conselhos e se fazer presente sempre, buscando me manter focado e feliz.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Biologia Molecular, bem como o BioGeR: Samantha, Samuel, Bel, Karol, Bené, Catarina e Eduardo.

Agradeço também ao professor Dr. Davi Farias, pelos conhecimentos repassados e disposição para me ajudar.

Ressalto também o meu agradecimento a Dra. Paula Perazzo, Thalia e Joellington pela ajuda, amizade, pelos perrengues vividos e histórias compartilhadas – momentos que marcaram a minha graduação.

À professora Dra. Marta Madruga, Dra. Marciane Magnani, Dr. Luis Fernando e Dr. Carlos Alberto Gadelha, que de alguma forma contribuíram com insumos e análises para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Maria Elieidy pela disposição em ajudar, sempre oferecendo seus conselhos com um sorriso no rosto.

A todos que de forma indireta e direta influenciaram a minha vida acadêmica e profissional.

À Universidade Federal da Paraíba pela estrutura e por possibilitar o desenvolvimento desta e outras pesquisas.

RESUMO

Domesticado a partir do teosinto há mais de cinco mil anos no continente americano, o milho (*Zea mays*) representa um dos vegetais com maior importância para o homem. A planta monocotiledônea pertencente ao gênero *Poaceae* possui aspectos próprios que conferem a este vegetal aplicabilidades tecnológica, alimentícia e fármaco-química. Quando em desenvolvimento dos corpos de frutificação, há a formação de espigas e dos estigmas associados. Tendo aparência similar a fios de cabelo, os estigmas do milho possuem diversas aplicabilidades terapêuticas associadas aos fitoquímicos presentes. O presente estudo, assim, propôs a criação de uma farinha a partir dos estigmas do milho e a prospecção de seus componentes, seja de importância nutricional e tecnológica, seja de potencial antibacteriano de extratos proteicos, seja de sua toxicidade frente à *Artemia franciscana*. A farinha foi obtida por meio do processo de liofilização seguida de moagem. Métodos de caracterização físicos e físico-químicos foram adotados juntamente com a identificação de macromoléculas de importância alimentar. Avaliou-se também a ocorrência de fatores antinutricionais, a aplicabilidade tecnológica (presença de proteases e amido, principalmente) e o perfil proteico nos diferentes extratos aquosos – obtidos por meio da extração da farinha em água, tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e tampões glicina. A farinha gerada apresentou valores nutricionais satisfatórios quando comparada a produtos equivalentes comerciais, com 8,53% ($\pm 0,37$) de proteínas, 4,042% ($\pm 0,25$) de cinzas, 0,8478% ($\pm 0,01$) de lipídeos, 8,46% de umidade e 78,12 % de carboidratos. Todos os extratos aquosos obtidos apresentaram fitoquímicos diversos, tais como taninos, saponinas, leucoantocianidinas, flavonas, flavonóis e xantanas, e a ausência de amido. Em relação aos componentes de aplicabilidade biotecnológica, identificou-se a presença de proteases no extrato glicina (0,1 mol. L⁻¹ pH 2,0) e a ausência de atividade hemaglutinante com os diferentes tipos de eritrócitos avaliados. Os extratos com o tampão glicina básico e ácido apresentaram o maior teor de proteínas solúveis: 0,837 mgP/mL e 0,740 mgP/mL, respectivamente. Para o extrato ácido, os resultados mostraram um *pool* de proteínas com duas bandas marcadas, variando com pesos abaixo dos 31 kDa. Quanto ao extrato básico, não foi possível a identificação detalhada. Os extratos concentrados em proteínas não demonstraram atividade antibacteriana para nenhuma das cepas avaliadas, inclusive as probióticas. A pesquisa da toxicidade frente à *Artemia franciscana* indicou que os

extratos adotados nas concentrações avaliadas não demonstraram mortalidade, superando, inclusive, a sobrevivência, quando comparada a do grupo controle. Desta forma, a farinha do estigma do milho demonstra ser rica no âmbito nutricional, com presença de proteases, tornando-a uma possível candidata a aplicações biotecnológicas. Além do mais, os extratos proteicos não demonstram ser tóxicos quando testados no organismo modelo *Artemia franciscana*, tampouco prejudiciais ao desenvolvimento de bactérias lácticas.

Palavras-chaves: Estigma do milho, *Zea mays*, farinha.

ABSTRACT

For over five thousand years, maize domestication controlled by teosinte has taken place in the American continent enabling *Zea mays* to represent one of the most important vegetables for humankind. The monocotyledonous plant belongs to the genus *Poaceae* and has typical characteristics that give rise to technological, food and pharmaceutical-chemical applications. When its fruiting bodies are being developed, there is the formation of ears and their associated maize silks. Looking like hair strand, maize silk has several therapeutic applications associated with its phytochemicals. The current study, thus, has proposed the creation of a flour made of maize silk and the prospect of its components, considering its nutritional and technological importance, the antibacterial potential of protein extracts and its toxicity to *Artemia franciscana*. The flour was generated by lyophilization process followed by milling process. Physical and physical-chemical characterization methods were adopted along with the identification of macromolecules that are important in food matters. It was also carried out an evaluation of antinutritional factors occurrence, technological applicability (presence of proteases and starch, mainly) and protein profile in different aqueous extracts – obtained through the extraction of flour in water, sodium phosphate buffer, sodium chloride and glycine buffers. The generated flour showed good nutritional values compared to equivalent commercial products: 8.53% (± 0.37) of proteins, 4.042% (± 0.25) of ash, 0.8478% (± 0.01) of lipids, 8.46% of humidity and 78.12% of carbohydrates. All the resultant aqueous extracts showed different phytochemicals such as *tannin*, *saponin*, *leucoanthocyanidin*, *flavone*, *flavonol* and *xanthan*, but the absence of starch. Regarding the components of biotechnological applicability, the presence of proteases in the glycine extract (0,1mol.L⁻¹ pH 2.0) and a lack of hemagglutinating activity with different types of the evaluated erythrocytes were identified. The extracts obtained from basic and acid glycine buffer showed the highest content of soluble proteins: 0.837 mgP/mL and 0.740 mgP/mL, respectively. For the acid extract, the results showed a pool of proteins revealing two relevant bands, ranging below 31 kDa. It was not possible to make a detailed identification for the basic extract. Protein-concentrated extracts did not demonstrate antibacterial activity for any of the evaluated strains, including the probiotic ones. The investigation about the toxicity to *Artemia franciscana* has indicated that the tested concentrations of extracts shows no mortality, overcoming

the survival rate when comparing it to the one from the control group. Thus, a flour made of maize silk proves to be nutritional rich, with the presence of proteases, becoming a possible candidate for biotechnological applications. Furthermore, protein extracts were not toxic when tested in the model organism *Artemia franciscana*, nor were they harmful to the development of lactic acid bacteria.

Keywords: Corn silk, Maize, Corn, Flour.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Milho e Teosinto	17
Figura 2 – Estruturas de Taninos.....	22
Figura 3 – Estigmas do Milho (<i>Zea mays</i>).	25
Figura 4 – Farinha do Estigma Liofilizado do Milho.....	26
Figura 5 - Extratos Brutos da Farinha do Estigma Liofilizado de <i>Zea mays</i>	39
Figura 6 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (12,5%) (na presença de SDS e β -mercaptoetanol).	41
Figura 7 – Teste de Toxicidade Frente à <i>Artemia franciscana</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Roteiro para Construção da Curva Padrão.	27
Tabela 2- Roteiro para Ensaio do Método Colorimétrico.	27
Tabela 3 – Concentração de Proteínas Solúveis e Teor de Nitrogênio Total dos Extratos Brutos da Farinha do Estigma Liofilizado de Zea Mays.	40
Tabela 4 – Amido e Fatores Antinutricionais Não Proteicos Avaliados na Farinha do Estigma Liofilizado de Zea Mays.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – Atividade de Água

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

BHI – Caldo “*Brain Heart Infusion*”

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DMSO – Dimetilsulfóxido

EA – Extrato Água

EB – Extrato Bruto

EF – Extrato Fosfato de Sódio Anidro 0,1 mol. L⁻¹ pH 7,4

EG2 – Extrato Glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 2,0

EG9 – Extrato Glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 9,0

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

ES – Extrato Salino (Cloreto de Sódio 0,15 mol. L⁻¹)

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FEL - Farinha Liofilizada do Estigma de Milho

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE – *Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate*

TEMED – *N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina*

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 O GÊNERO <i>Poaceae</i>	16
2.1.1 <i>Zea mays</i>	16
2.2 FARINHAS E ALIMENTOS NÃO CONVENCIONAIS COMO FONTE NUTRACÊUTICA E FUNCIONAL	19
2.3 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS E/OU BIOTIVOS EM VEGETAIS.....	20
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 OBTENÇÃO DA FARINHA DO ESTIGMA DE <i>Zea mays</i>	25
4.2 CARACTERIZAÇÕES FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA.....	26
4.2.1 Proteínas Totais	26
4.2.2 Umidade	28
4.2.3 Lipídeos Totais	28
4.2.4 Cinzas	29
4.2.5 Carboidratos Totais	29
4.2.6 Atividade de Água (Aa).....	29
4.2.7 pH da Farinha do Estigma Liofilizado	30
4.2.8 Identificação de açúcares.....	30
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DA FARINHA	30
4.4 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DO ESTIGMA LIOFILIZADO	31
4.4.1 Perfil Proteico.....	31
4.4.2 Dosagem de Proteínas Solúveis e Totais.....	31
4.5 COMPONENTES ANTINUTRICIONAIS E DE IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA.....	32
4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS	34
4.6.1 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia franciscana</i>	34
4.6.2 Avaliação do potencial antibacteriano.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA LIOFILIZADA DO ESTIGMA DE <i>Zea mays</i>	37
5.1.1 Composição proximal.....	37

5.1.2 Atividade de água	37
5.1.3 pH	38
5.1.4 Identificação de açúcares	38
5.2 EXTRATOS BRUTOS	39
5.2.1 Proteínas da FEL	40
5.2.2 Perfil Eletroforético	40
5.3 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS E/OU BIOTIVOS	41
5.3.1 De origem não proteica.....	41
5.3.2 De origem proteica	42
5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	43
5.4.1 Atividade antibacteriana	43
5.4.2 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia franciscana</i>	44
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios do surgimento das espécies, as plantas vêm ganhando cada vez mais espaço no meio científico. Segundo o Willis (2017), contam-se mais de 391.000 espécies catalogadas. Destas, apenas uma pequena parcela tem sido estudada a respeito de sua fisiologia e demais características, e uma porção ainda menor representa as plantas utilizadas pelo homem na alimentação, onde 90% compreendem apenas 20 espécies, sendo o trigo, milho e arroz ocupando mais da metade dessa parcela (WILSON, 2012).

Os vegetais são uma fonte de diversidade de moléculas, muitas bioativas e de alto interesse farmacêutico. As moléculas bioativas vegetais apresentam alta aplicabilidade, devido à variabilidade de propriedades funcionais e compostos bioativos, uma vez que são capazes de desempenhar efeitos curativos, terapêuticos, fisiológicos, antibacterianos, antioxidantes, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2009; SOARES et al., 2016). Desta forma, reforça-se a necessidade de obtenção acerca da diversidade vegetal para se elucidar aplicabilidades das moléculas vegetais, para que se possa obter novos alimentos funcionais.

Dentre os alimentos funcionais destacam-se algumas farinhas, as quais são obtidas por meio da moagem de partes de vegetais comestíveis, passando por processos tecnológicos adequados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1978). As composições das farinhas variam de acordo com a origem e os processos tecnológicos aplicados na produção. Devido a sua alta aplicabilidade no preparo de diversos outros alimentos e sua difusão em dietas, as farinhas devem ser avaliadas quanto a sua composição em elementos, tais como proteínas, carboidratos, umidade, acidez e lipídeos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Na literatura há a descrição de diversas propostas de novas farinhas vegetais como fonte de macromoléculas, sendo fontes nutricionais promissoras. Entretanto, ao se propor um novo alimento, um estudo sobre a toxicidade deve ser avaliado. A toxicidade do componente alimentar pode ocorrer em função de um ou diversos compostos nele presentes, causando danos a saúde de quem o consome (MOURA et al., 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O GÊNERO *Poaceae*

A família botânica *Poaceae* (anteriormente *Graminae*) apresenta cerca 10.000 espécies, divididas em mais de 700 gêneros. Ocupam áreas abertas, distribuindo-se pelas mais diferentes regiões do planeta (GPWG 2001), desde desérticas até regiões de frio extremo, como na Antártica (BOLDRINI et al., 2005). Oliveira (2006) estima que 1/3 da cobertura vegetal do planeta seja dominada pela família *Poaceae*. Composta por plantas monocotiledôneas apresentam como características o crescimento primário, folhas paralelinérveas, dísticas (CHASE e SENDULSKY, 1991), em sua maioria fotossíntese do tipo C4, com nós marcados no caule e flores pequenas.

O grupo botânico é de grande interesse comercial, responsável por abrigar as espécies tais como o arroz (*Oryza* sp.), aveia (*Avena sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale*), milheto (*Pennisetum glaucum*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum* sp.), estas amplamente cultivadas para fins alimentares e tecnológicos.

2.1.1 Milho (*Zea mays*)

O *Zea mays*, conhecida comumente como milho, representa um vegetal de ampla aplicação, desde produto alimentício de homens e animais, e uso na indústria para geração de energia. Está ligado diretamente a diversas culturas do mundo em diferentes civilizações indígenas da América do Sul, as quais foram responsáveis pela domesticação e seleções próprias deste cultivar como complemento da dieta (STALLER et al., 2006). Na América Central data-se o cultivo das plantas de milhos há pelo menos cinco mil anos, sendo originada de uma gramínea selvagem conhecida como teosinto (DERMASTIA et al., 2009).

Figura 1 – Milho e Teosinto.



Na esquerda encontra-se na imagem de diversas espigas de milho (*Zea mays*), a direita o teosinto (*Zea sp.*).

Fonte: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2019/01/10/caminhos-do-milho-2/>> e <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/Esalq-VA13-Milho.pdf>>

A planta possui cerca de um pouco mais 2 metros, apresenta flores do tipo monóicas, ou seja, hermafroditas, sendo a parte masculina e feminina localizadas em diferentes partes da inflorescência (INGLETT, 1970). As flores masculinas estão localizadas na parte mais ao topo e são responsáveis pela produção do pólen, já as femininas estão mais próximas da axila das folhas, sendo responsáveis pela formação do estigma. Os estigmas se assemelham a fios de cabelo, tendo como função a captura do pólen para polinização. Estes surgem entre 10 e 14 dias após a germinação, onde apresentam inicialmente tons esverdeados e à medida que o milho vai se tornando maduro, ganham tonalidades de marrom medindo cerca de 15 - 17 cm (TAO et al., 2006).

Segundo os dados apresentados pela FAO (*Food and Agricultural Organization of United Nations*), no ano de 2016 o Brasil apresentou a terceira maior produção mundial de milho, com indicativos que no biênio 2019 - 2020 alcance o topo de produção mundial (FAOSTAT, 2019). O crescimento reflete diretamente na importância e apelo econômico que o cultivar possui, tais características se devem justamente às propriedades nutricionais e tecnológicas que a planta é capaz de propiciar.

As sementes são destinadas em sua maioria à produção de farinhas e óleos, os quais são empregados na alimentação de humanos e outros animais, bem como aves e ruminantes. Entretanto, devido a massiva produção agrícola, é imprescindível a

produção de montantes compostos pelas demais partes da planta que muitas vezes são desprezadas, por não haver demais conhecimento sobre as suas aplicabilidades.

Uma alternativa ao aproveitamento é destinar estes subprodutos para produção de silagem. Contudo, para a produção da silagem de milho, leva-se em conta a escolha de plantas com maiores alturas e tamanho das espigas (ZOPOLLATO, 2007). Ocasionalmente assim, a rejeição de plantas que não atendem ao padrão, havendo ainda acúmulo de massa vegetal com destinação incerta.

A produção de biodiesel a partir da biomassa do milho é outra área que vem apresentando crescimento significativo (DHUGGA, 2006), porém não chega a suprir toda a demanda de utilização destes resíduos produzidos pelas plantações de *Z. mays*.

2.1.1.1 Estigma do Milho: Uso na Medicina Alternativa e Bioatividade

O cabelo do milho possui em sua composição uma gama de nutrientes e fitoquímicos como alcaloides, taninos, sais minerais, carboidratos, proteínas e diversas moléculas voláteis (KWAG, 1999). Os compostos encontrados favorecem o seu emprego como agente na elaboração de remédios ou alimentar.

O estigma do milho é amplamente utilizado como fitoterapêutico na medicina alternativa na China, França, Turquia e Estados Unidos, sendo utilizado na forma de infusão para aplicações em diversas patologias, agindo como diurético, empregado no tratamento de cistos, edemas, doenças na próstata, infecções urinárias e obesidade (HU et al., 2010; BASTIEN, 1982; YESILADA, 1995). Hasanudin et al. (2012) descreve as bioatividades a respeito dos compostos presentes no cabelo do milho, dentre estas estão à atividade antidepressiva, antioxidante, diurética, redução da hiperglicemia, antidiabética, antihiperlipidêmica, neuroprotetiva, anti-inflamatória e redução da nefrotoxicidade.

No Brasil a aplicabilidade fitoterapêutica do “cabelo do milho” ainda é pouco conhecida, ou muito escassa, há poucos relatos na literatura do uso em diferentes comunidades. Nunes (2019) executou uma pesquisa de forma qualitativa com grupos de mulheres em Ouro Preto – MG, na qual houve relatos de algumas que faziam o uso do chá dos estigmas para o tratamento da hipertensão, tratamento de infecções urinárias e como diurético. Posse (2007), também apresenta em seu trabalho de etnobotânica relatos no Rio de Janeiro – RJ com as mesmas aplicabilidades desta parte da planta do milho, adicionando-se o conhecimento para o tratamento de cistos. Já Barbosa (2007),

descreve também o uso popular para o tratamento de doenças cardíacas e febre. O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2018) descreve o uso deste produto na forma de tintura, com uso oral, sendo indicado para auxiliar na retenção hídrica. Contudo, apesar de tantas propriedades terapêuticas e uso do cabelo do milho como componente alimentar é pouco empregado. Suas propriedades nutricionais são pouco estudadas.

2.2 FARINHAS E ALIMENTOS NÃO CONVENCIONAIS COMO FONTE NUTRACÊUTICA E FUNCIONAL

Para a ANVISA as farinhas são: “o os produtos obtidos de partes comestíveis de uma ou mais espécies de cereais, leguminosas, frutos, sementes, tubérculos e rizomas por moagem e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para produção de alimentos” (BRASIL, 2005). As farinhas compõem uma fonte de alimento de grande importância nutricional e alimentar, onde se têm o destaque para a produção a partir de cereais, sendo a de trigo com maior produtividade.

Os cereais como centeio, trigo, aveia e cevada apresentam em suas composições duas classes de proteínas de interesse nutricional: as gluteninas e gliadinas, que quando hidratadas geram o glúten (MONTEIRO 2017). Entretanto alguns indivíduos são portadores da doença celíaca, uma doença autoimune no qual os portadores desencadeiam uma resposta alérgica ao consumo do glúten (ARAÚJO 2010). Sendo assim o tratamento e prevenção da doença se faz por meio do consumo de alimentos livres destas moléculas. Entretanto, preparos alimentícios com farinhas e livres de glúten como pães, biscoitos e bolos são apresentados pelas indústrias com elevado valor.

Já os produtos nutracêuticos não possuem uma definição bem regulamentada, entretanto, considera-se como um composto encontrado em alimentos, os quais visam a manutenção da saúde, evitando doenças, não previstos na nutrição convencional (GOMES et al. 2017). Diversas farinhas não convencionais possuem características funcionais e compostos nutracêuticos a exemplo da farinha de banana verde a qual apresenta fitoesteróis e fenólicos, sendo considerado um alimento antioxidante (SILVA et al. 2015). A farinha da casca do maracujá também é considerada um alimento funcional não convencional, já que suas cascas geralmente são resíduos na produção de polpas, uma vez que dificilmente são empregadas como foco na alimentação, seja

humana ou animal (MACAGNAN 2013). As cascas possuem uma elevada quantidade de fibras, e moléculas nutracêuticas como a pectina e antioxidantes, favorecendo a prevenção do diabetes, controle do colesterol e auxiliando na perda de peso (HORN, 2014). Franco (2006) salienta que os nutracêuticos são geralmente disponibilizados e comercializados na forma processada e em formulações (cápsulas, drágeas), os alimentos funcionais não são considerados como o alimento propriamente dito, prontos para o consumo.

Na literatura há diversos trabalhos apontando a ampla ocorrência de plantas alimentícias não convencionais no território brasileiro (PANC's), devido a sua vasta extensão e variabilidade de espécies vegetais (KELEN et al. 2015). Se consumido, cabelo da inflorescência do *Zea mays* não entraria no critério de uma PANC, pois o os grãos de milho já são amplamente consumidos. Entretanto além das plantas alimentícias não convencionais, há também o apelo para a categoria dos alimentos não convencionais, englobando o consumo e aproveitamento de novas partes de plantas alimentícias conhecidas pelo homem. Na categoria de alimentos não convencionais destacam-se a proposta do consumo de partes não habituais da bananeira, tais como a inflorescência (CARDOSO, 2007) e a seiva do pseudocaule (FERIOTTI, 2010).

O estigma do milho também apresenta em sua composição diversos compostos como fenóis, moléculas com propriedades antibacterianas, diuréticas, antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetiva, dentre outras (HASANUDIN, 2012). Para que o cabelo de milho consumido na forma de farinha seja considerado como um alimento funcional e nutracêutico, este deve conter compostos capazes de apresentarem propriedades fitoterapêuticas.

Entretanto, para avaliar a seguridade alimentar de novas farinhas funcionais e compostos nutracêuticos, deve-se levar em conta a toxicidade e os riscos a saúde, sendo necessário a avaliação destes compostos com a interação com fármacos e riscos da ingestão em longo prazo (SALVI e MAGNUS, 2014).

2.3 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS E/OU BIOTIVOS EM VEGETAIS

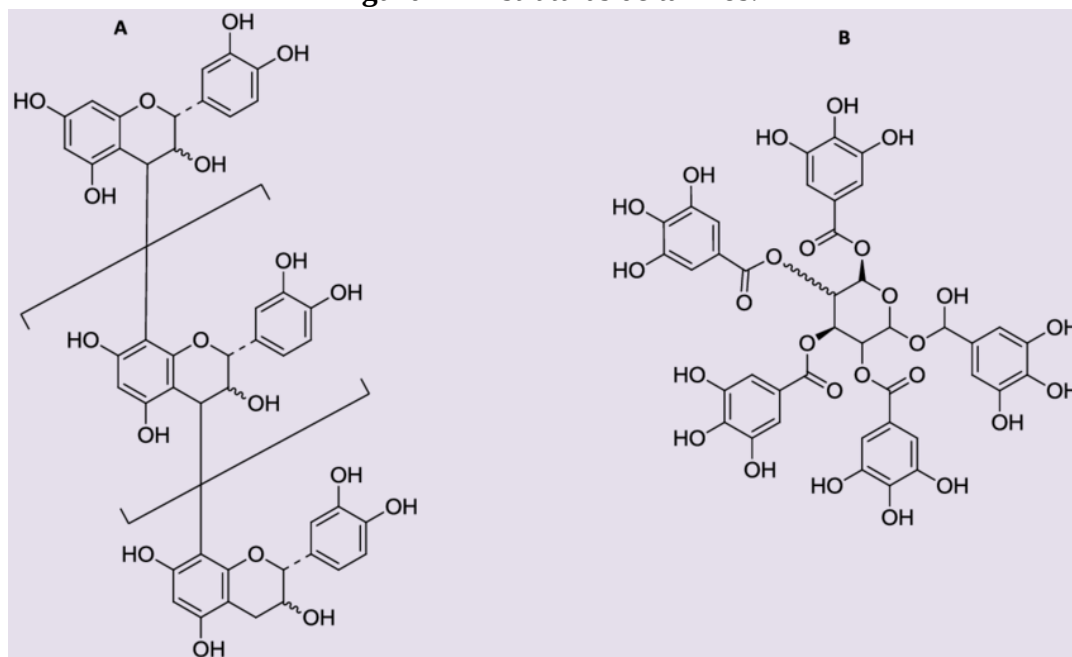
Compostos fitoquímicos são conhecidos como metabólitos secundários, gerados por processos bioquímicos existentes nos vegetais, ou seja, são formados como

consequência de atividades bioquímicas primárias, sejam pela reprodução ou crescimento da planta.

Compreendem uma gama de compostos com variadas composições, a exemplo de óleos essenciais, compostos nitrogenados, fenólicos, terpenóides. Muitos são produzidos em função de resposta ao estresse do vegetal frente às condições ambientais, alguns apresentam efeitos tóxicos, medicinais ou associados a importância ecológica (BALADRIN et al., 1985; DI STASI, 1995; RISPAIL et al., 2005).

Dentre os metabólitos secundários antinutricionais, os compostos fenólicos são amplamente difundidos e apresentam uma ou mais hidroxilas (OH) na sua constituição (CASTRO et al., 2004). Os flavonoides são um subgrupo ao qual inclui os flavonóis (catequinas e taninos condensados), flavonas, flavononas, isoflavonas e antocianidinas. Os polifenóis abrigam os taninos hidrolisáveis, estilbenos, flavonoides e lignanas (MANACH et al., 2004; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Os taninos são substâncias amplamente distribuídas nas mais diferentes famílias botânicas, também incluindo as de importância alimentar, bem como *Poaceae* (em cereais: cevada e sorgo) e leguminosas (favas) (JANSMAN, 1993). São classificados em dois tipos: os hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou condensados (FERRÃO et al., 2003). Possuem como características atribuir sabor adstringente aos alimentos e diminuir sua palatabilidade, além de se associarem às proteínas, impedindo sua atividade biológica. Entretanto, apresentam também propriedades como antioxidantes e antimicrobianas (OKUDA et al., 1992).

Figura 2 – Estruturas de taninos.

A: Tanino condensado. B: Tanino hidrolisável. Em destaque na estrutura A, uma unidade de catequina.

Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Estruturas-de-taninos-A-Tanino-condensado-B-Tanino-hidrolisavel-Em_fig3_285167422

As saponinas são uma classe de fitoquímicos com propriedades de formação de espuma e surfactantes ambas em soluções aquosas (OLESZEK e BIALY, 2006), emulsificantes (PRICE et al., 1987) e hemolíticas (CAMPOS-VEGA et al., 2009). A atividade antinutricional ocorre devido a associação destes compostos com a mucosa intestinal, interferindo na absorção dos nutrientes (JOHNSSON et al., 1982).

As lectinas são uma classe de proteínas e glicoproteínas de ampla distribuição nos mais diversos organismos, desde procariontes a eucariontes. Foram primeiramente relatadas por S. Weir Mitchell em 1860, identificadas a partir de veneno de serpente, e posteriormente, encontradas em componentes vegetais. Estas proteínas se caracterizam por apresentarem como principal característica a sua origem não imune, além de possuir ao menos um domínio não catalítico de ligação específica (reversível) com carboidratos, podendo ser estes monossacarídeos ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Estas proteínas pertencem a uma classe que desempenham diferentes papéis fisiológicos nas plantas, no que se refere a defesa contra patógenos e efeito antinutricional para insetos e outros animais como humanos (PEUMANS e VAN

DAMME, 1995; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004), atuando também na modulação de atividade enzimática e como proteínas de reserva.

Estudos de Bardocz (1992; 1996) apontam que quando presentes em dietas de animais experimentais, as lectinas causam lesões ao epitélio e aumento do intestino delgado, além de redução do crescimento. Quando consumidas por humanos em sua forma ativa, podem induzir a um quadro de toxicidade aguda oral, podendo causar diarreias, náuseas, distensão abdominal e hiperplasia (VASCONCELOS e OLIVEIRA 2004). Esse efeito antinutricional das lectinas pode ser reduzido com o tratamento térmico. No entanto, o cozimento ineficiente pode não inativar totalmente as referidas proteínas.

Com o passar dos anos e a crescente investigação destas proteínas, mais atividades foram sendo atribuídas ao emprego destas moléculas, principalmente relacionadas à resposta inflamatória, antibacteriana, antifúngica e diversas outras atividades biológicas de interesse fármaco-terapêutico e biotecnológico (FERNANDES, 2011; BARBOSA, 2013; SILVA SÁ, 2017).

Além das lectinas, têm-se as proteases como moléculas de natureza proteica e funcional. São classificadas como proteases as enzimas que exercem a capacidade de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas-alvo. São classificadas como exopeptidases as que apresentam atividade proteolítica sob as extremidades das proteínas (N- e C- terminais), e endopeptidases as que exercem catálise no interior das proteínas (BARRETT et al., 2004). As exopeptidases por sua vez se dividem em dipeptidil peptidases, tripeptidil peptidases, carboxipeptidases, aminopeptidases, dipeptidases, tripeptidases e peptidildipeptidases (FERNANDES, 2011). Já as endopeptidases (proteínases) são divididas quanto ao seu mecanismo de ação, sendo as serínicas, aspárticas, cisteínicas e metaloproteinases (BARRETT et al, 2004).

As proteases de origem vegetal são altamente utilizadas pela indústria biotecnológica, dentre estas a bromelina, queratinase e papaína (MORIHARA e ODA, 1993). A diversidade de funções biológicas dessa classe faz destas ótimas candidatas aos mais diferentes empregos, como em detergentes e na área alimentícia (GODFREY e WEST, 1996; MAURER, 2004), além da área da saúde, a exemplo da farmacêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características nutricionais, antinutricionais e biológicas da farinha de estigma de milho (*Zea mays*) com potencial para aplicabilidades biotecnológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar compostos de importância nutricional, e antinutricionais de matriz proteica e não proteica e detecção de proteases;
- Avaliar a atividade antibacteriana das frações proteicas presentes na farinha;
- Avaliar a toxicidade dos extratos proteicos em *Artemia franciscana*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA FARINHA DO ESTIGMA DE *Zea mays*

A farinha do estigma de milho (*Zea Mays*) - cabelo do milho (Figura 3) foi obtida de estigmas frescos de milhos comercializados no Mercado Central da cidade de João Pessoa, Paraíba. A amostra foi lavada com água corrente, seguida de água destilada, seca em papel toalha e congelada para liofilização.

A amostra liofilizada foi moída, dando origem a farinha (Figura 4), guardada em frascos herméticos para posterior análise.

Figura 3 – Estigmas do milho (*Zea mays*).



Fonte: Autor, 2020

Figura 4 – Farinha do estigma liofilizado do milho.



Fonte: Autor, 2020.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA

4.2.1 Proteínas Totais

A análise de proteínas totais foi realizada por meio da quantificação do nitrogênio total presente nas amostras, utilizando a metodologia de digestão de Kjeldahl juntamente com o método colorimétrico de Baethgen e Alley (1989) com adaptações, utilizando o fator de 5,65 para determinação.

Inicialmente, foi realizado a digestão das amostras utilizando o método semi-micro Kjeldahl. Cerca de 0,5 g da farinha foram pesados em papel manteiga e dispostos em tubos de digestão com 7 mL de ácido sulfúrico P.A. com densidade 1,84 g/mL e 2 g de mistura catalítica [K_2SO_4 ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; (10:1)]. Os tubos foram levados ao digestor (SOLAB, modelo SL-25/40) a temperatura inicial de 50 °C, com aumentos consecutivos de 50 °C em 50 °C com intervalos de 30 minutos até atingir 400 °C; a digestão foi finalizada quando o líquido apresentou coloração transparente ou levemente esverdeada (média de 4-6 h). Após resfriamento, as amostras foram diluídas em água ultrapura em balões volumétricos de 100 mL.

Após a digestão, as amostras foram analisadas utilizando o método colorimétrico de Baethgen e Alley (1989). Para este método é necessário o uso de quatro soluções

preparadas no volume de 1000 mL: Solução 1: pesou-se 26,8 g de fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 50 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 40 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 80 g de água destilada; para 1 L de Solução 2, foram necessários 150 g de salicilato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$) e 0,3 g de nitroprussiato de sódio [$\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})$]; a Solução 3 consistiu de hipoclorito de sódio (NaClO) a 6%, e foi preparada imediatamente antes do experimento; por fim, para 1 L do diluente, utilizou-se 22 g do catalisador usado na digestão e 61,1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

A curva padrão de nitrogênio foi preparada utilizando uma solução padrão de sulfato de amônio (0,11798 g de $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$ e 100 mL do diluente), seguindo a Tabela 1.

Tabela 1 - Roteiro para construção da curva padrão.

Tubo	Solução Padrão (μL)	Diluente (μL)	Solução 1 (μL)	Solução 2 (μL)	Solução 3 (μL)	Concentração de Nitrogênio (g/L)
Branco	0	1000	5500	4000	2000	0
1	10	990	5500	4000	2000	2,5
2	15	985	5500	4000	2000	3,8
3	20	980	5500	4000	2000	5,1
4	25	975	5500	4000	2000	6,4
5	30	970	5500	4000	2000	7,6
6	35	965	5500	4000	2000	8,9
7	40	960	5500	4000	2000	10,2
8	45	955	5500	4000	2000	11,4
9	50	950	5500	4000	2000	12,7

Fonte: Autor, 2020.

A quantificação de nitrogênio das amostras foi realizada em triplicata com 50 ou 100 μL (a depender da quantidade de proteína, de forma a permitir o enquadramento dentro dos valores da curva padrão) do produto da digestão anteriormente diluído em balões de 100 mL. O somatório amostra+diluente deve ser igual a 1 mL, e o ensaio foi realizado de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2- Roteiro para ensaio do método colorimétrico.

Tubo	Amostra (μL)	Diluente (μL)	Solução 1 (μL)	Solução 2 (μL)	Solução 3 (μL)
-------------	---	--	---	---	---

Branco	0	1000	5500	4000	2000
1	50	950	5500	4000	2000
2	100	900	5500	4000	2000

Fonte: Autor, 2019.

Após adição de todas as soluções, os tubos foram agitados e levados ao banho maria a 37 °C por 15 minutos. Por fim, foi realizada leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Drawell modelo DU-8200) a 650 nm.

4.2.2 Umidade

A umidade da farinha foi obtida segundo a metodologia do Instituto Adolf Lutz (1985). Inicialmente, pesou-se 2 g da amostra em cápsula de metal, previamente tarada e, em seguida, levou-se para estufa a 105 °C por 24 horas. Decorrido esse tempo, o material foi levado ao dessecador até a amostra atingir a temperatura de ± 25 °C para ser pesado.

4.2.3 Lipídeos Totais

Para quantificação de lipídeos totais adotou-se o método de Folch et al. (1957), por meio de extração com solvente a frio, em que a amostra foi submetida a extração em clorofórmio e metanol (2:1) seguida de evaporação do solvente em estufa.

Béqueres de 50 mL foram previamente secos em estufa a 105 °C por 1 hora, e, posteriormente, resfriados em dessecador e pesados. Em seguida, adicionou-se 20 mL da mistura clorofórmio – metanol a 1 g da amostra e agitou-se por 5 minutos.

Ao final da agitação, a amostra foi filtrada com funil e papel filtro qualitativo (± 14 μ m). O volume final do extrato filtrado foi anotado.

Adicionou-se 20% do volume final do extrato filtrado, uma solução de sulfato de sódio a 1,5%, agitado e deixado em repouso até separar as fases mantendo a proveta fechada. O volume da fase inferior correspondente a fração de lipídeos a fase superior foi descartada com o auxílio de uma pipeta.

Uma alíquota de 5 mL do extrato (fase inferior) foi transferida para o béquer. Os béqueres foram acondicionados em estufa (Tecnal, Modelo TE-394/2) com

ventilação a 105 ° C até a volatilização completa do solvente, em seguida, levados para dessecador e pesados.

O experimento foi realizado em triplicata, e a porcentagem de lipídeos foi determinada através da Equação 1.

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{\text{VFI} \cdot (\text{MF} - \text{MI})}{5 \cdot \text{MA}} \quad (1)$$

Onde:

- VFI = Volume da fase inferior;
- MF = Massa final;
- MI = Massa inicial;
- MA = Massa da amostra.

4.2.4 Cinzas

A matéria mineral da amostra foi obtida por meio do emprego da metodologia descrita pela AOAC (1998). Pesou-se 1 grama da amostra em triplicata, que em seguida foi disposta em cadinhos de porcelanas livres de umidade, e levadas ao forno mufla (Quimis, Modelo Q-318m24) a 550 °C por 5 h. A porcentagem de matéria mineral foi obtida conforme indicado na Equação 2.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Peso Inicial da Amostra}}{\text{Peso Final da Amostra}} \cdot 100 \quad (2)$$

4.2.5 Carboidratos Totais

A porcentagem de carboidratos totais foi obtida por meio da diferença dos valores dos demais constituintes avaliados através da Equação 3.

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - \% \text{ Cinzas} - \% \text{ Proteínas} - \% \text{ Lipídeos} - \% \text{ Umidade} \quad (3)$$

4.2.6 Atividade de Água (Aa)

A fim de avaliar a seguridade da farinha frente à disponibilidade de água ao crescimento de microrganismos, realizou-se a análise de atividade de água (Aa), por meio da leitura direta em equipamento específico (Aqualab®) a 25 °C.

4.2.7 pH da Farinha

Seguindo a recomendação do Instituto Adolfo Lutz, pesou-se 1 grama da amostra e adicionou-se 20 mL de água ultrapura. Passados 20 minutos, o pH da amostra foi verificado em potenciômetro. O teste foi realizado em triplicata, e o resultado foi obtido por meio da média dos valores (25 °C).

4.2.8 Perfil de açúcares

Inicialmente, a farinha foi diluída em água (1:10 m/v), mantido sob agitação por 3 h para a obtenção do extrato. Ao final do tempo extrato foi centrifugado a 9.000 g por 20 minutos, descartando o precipitado e o sobrenadante coletado. O sobrenadante foi então novamente centrifugado a 12000 g por mais 15 minutos, posteriormente foi em filtrado em filtro de 22 µm e reservado.

A detecção e quantificação dos açúcares presentes na amostra foi realizada em coluna Agilent Hi-Plex Ca (7,7 x 300mm, 8 µm) acoplada em cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC (VARIAN, Waters, Califórnia, USA).

A corrida foi realizada a temperatura de constante de 85 °C com fluxo constante de 0,6 mL/min, utilizando como fase móvel água ultrapura. A corrida foi realizada em um tempo de 30 minutos após a aplicação da amostra (15 µL). Os cromatogramas foram obtidos por meio de detector de índice de refração (VARIAN), e *software* de processamento “GALAXIE Chromatography Data System”.

Os resultados foram obtidos por meio do cruzamento com padrões de açúcares com alto grau de pureza. O teste foi realizado em duplicata, onde os valores foram obtidos por meio das médias de cada réplica.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS PROTEICOS DA FARINHA

As proteínas foram extraídas da farinha do estigma liofilizado (FEL). Para a extração das proteínas, utilizou-se 1 g de farinha para 20 mL da solução de extração, seguida de agitação por 3 h a 25 ° C. As soluções utilizadas foram: cloreto de sódio 0,15

mol. L⁻¹; tampão fosfato de sódio anidro 0,1 mol. L⁻¹ pH 7,4; tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 2,0 e tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 9,0; água ultrapura. Após a extração foi realizado a centrifugação a 6000 g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para os testes posteriores. Após coleta, o sobrenadante foi dialisado em membranas de 8 kDa por no mínimo 10 vezes contra água destilada em intervalos de troca a cada 1 hora.

4.4 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DO ESTIGMA LIOFILIZADO

4.4.1 Perfil Proteico

O perfil proteico das proteínas, foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida. A SDS-PAGE foi realizada segundo método descrito por Laemmli (1970).

O gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto o gel de separação foi preparado com concentração de 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,02%. Posteriormente, foram aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 minutos, centrifugadas por 1 minuto a 1500 rpm.

Ao gel foi aplicada uma corrente constante de 25 mA, 200 V e 15 W. No término da corrida, o gel foi fixado em solução de ácido tricloroacético 12,5% por 1 h, em seguida corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada por meio da exposição em solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v).

4.4.2 Dosagem de Proteínas Solúveis e Totais

A dosagem de proteínas solúveis nos extratos brutos (EB) foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), onde 100 µL do extrato foram adicionados em tubos de ensaios e logo após adicionado 2,5 mL do reagente, aguardando o decorrer de 10 minutos para proceder a leitura em espectrofotômetro, comprimento de 595 nm. O teste foi realizado em triplicata.

4.5 COMPONENTES ANTINUTRICIONAIS E DE IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA

Os fatores antinutricionais das matrizes não proteicas foram avaliados de forma qualitativa nos diferentes extratos, empregando as metodologias descritas por Barbosa et al. (2001), Matos (1997), Robbers et al (1997), Miranda et al (2013), Mello e Santos (2004) e Skoog et al (2014) com adaptações. Para os ensaios, utilizaram-se os extratos brutos sem diálise.

4.5.1. Amido

A presença de amido nos diferentes extratos foi observada por meio da mudança de coloração do meio. Foram distribuídos 1 mL das amostras em tubos de ensaio, em seguida adicionados 500 µL de corante lugol e aguardou-se 5 minutos para observação do resultado. Quando positivo para presença de amido, o meio torna-se azul.

4.5.2 Saponinas

Foram adicionados 1,0 mL de cada soluções dos extratos em tubos de ensaios, e diluídos; posteriormente, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e 1,250 µL de água destilada. Os tubos foram agitados por 3 minutos vigorosamente em agitador do tipo Vortex, decorrido este tempo os tubos permaneceram por 5 minutos em repouso.

4.5.3 Taninos pirogálicos e catéquicos

Foram dispostos em tubos de ensaios 1 mL de cada solução dos extratos, e adicionados 4 gotas de FeCl_3 a 1%; após a agitação, os tubos foram deixados em repouso por 5 minutos. Quando positivo para taninos catéquicos há a formação de um precipitado verde, já para pirogálicos o precipitado se apresenta na tonalidade azul.

4.5.4 Flavonóis, flavonas e xantonas

Para avaliar a presença destes compostos fitoquímicos, dispôs-se em dois tubos de ensaio, 500 µL de HCl 5,0 mol.L⁻¹ e 1,0 mL de água destilada; por fim, foram adicionados aos mesmos 10 mg de MgSO₄ e 2,0 mL da solução dos extratos. Os tubos foram levados a estufa a 37 °C por 20 minutos e observado o aparecimento da cor vermelha no meio, indicando assim positivo para estes compostos.

4.5. 5 Leucoantocianidinas

Em tubos de ensaios longos, distribuíram-se 10 mL dos extratos, onde foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado. Em seguida, a amostra foi conduzida ao bico de Bunsen até a ebulição. O teste é considerado positivo quando o meio apresentar coloração avermelhada.

4.5.6 Lectinas

A presença de lectina (atividade lectínica) foi avaliada por meio da capacidade hemaglutinante frente aos eritrócitos de frango e boi, adquiridos em abatedouros. Empregou-se a metodologia descrita por Debray et al. (1981) e Moreira e Perrone (1977) com adaptações.

4.5.7 Análise Qualitativa de Proteases

Para a determinação qualitativa de proteases observou-se a ocorrência da hidrólise da gelatina, sendo a metodologia descrita por Lima et al. (2008), com adaptações. A gelatina incolor e sem sabor foi empregada no experimento, obtida de forma comercial e preparada diluindo 12 g de gelatina em 200 mL de água fria destilada. A solução foi levada micro-ondas em alta potência por 30 s. Em seguida, foram dispostos em diferentes frascos 10 mL da solução de gelatina junto com 3 mL de cada extrato bruto.

Para o controle positivo utilizou-se proteases de *Bacillus licheniformis* e controle negativo apenas a adição de água. Ambos foram homogeneizados e colocados por 30 minutos a 4 °C para que ocorresse a solidificação da gelatina. Ao final do tempo decorrido, foram analisadas a ocorrência da geleificação, tomando como positivo a amostra líquida ou parcialmente viscosa e negativo a amostra geleificada, similar ao controle negativo (água + gelatina).

4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para os ensaios biológicos foram avaliados os extratos EG2 (tampão glicina 0,1 M, pH 2,0) e EG9 (tampão glicina 0,1 M, pH 9,0), previamente dialisados contra água ultrapura, e em seguida liofilizados. Adotou-se esse passo para haver uma maior concentração das proteínas e avaliar sua bioatividade.

4.6.1 Ensaio de toxicidade em *Artemia franciscana*

Os cistos de *Artemia franciscana* foram adquiridos da empresa Artemia International LLC (Texas, EUA; taxa de eclosão: 90%). Os cistos foram armazenados em microtubos de plástico (1,5 mL), contendo 10 mg cada, refrigerados a 4 °C, lacrados com Parafilm® e mantidos no escuro até o momento do uso.

Para a eclosão dos cistos, 10 mg dos mesmos foram dispostos em placas de petri contendo 12 mL de ASW (do inglês, “*Artificial Seawater*”; salinidade 33, pH 8) e mantidos à 25 °C por 48 h. A ASW foi preparada segundo Vogel et al. (1999). Os cistos foram expostos à luz constante durante as primeiras 24 h (3000 a 4000 lúmens). Após esse período, com o auxílio de uma micropipeta, os náuplios foram transferidos para uma nova placa de petri contendo ASW e mantidos, no escuro, a 25 °C, por mais 24 h.

Para a realização dos ensaios de toxicidade, as larvas no estágio Instar-II foram dispostas em placas de cultura de 24 poços (10 náuplios/poço; 2 mL/poço em ASW; controle negativo sem extrato proteico) e expostas a 4 concentrações dos extratos proteicos (0,1; 1; 10 e 100 µg/mL). As placas foram armazenadas no escuro a 25 °C. A sobrevivência das larvas foi analisada 24, 48 e 72 h após o início da exposição e a análise realizada sob luz invertida. Eram consideradas mortas as larvas que permaneciam imóveis por mais de 10 segundos (ZULKIFLI et al., 2014).

O estágio Instar-II foi escolhido para a realização dos experimentos, pois é considerado o mais sensível para os ensaios de toxicidade, uma vez que, neste estágio, ocorre a abertura do trato gastrointestinal da larva (SORGELOOS et al., 1978).

O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$; $CL_{50} = 12,6 \mu g/mL$, obtido em ensaios prévios) foi utilizado como controle positivo. No controle negativo foi adicionado o mesmo volume de água ultrapura correspondente ao volume do extrato proteico colocado nos poços tratados.

Os experimentos foram realizados 3 vezes, de maneira independente e em triplicata.

4.6.2 Avaliação do potencial antibacteriano

Para o ensaio foram utilizadas as seguintes cepas patogênicas: *Klebsiella pneumoniae* HS11286, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella typhi* CBAM 0015, *Escherichia coli* CBAM 0001, *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 0024, cedidas gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz. Já as cepas não patogênicas utilizadas foram: *Bifidobacterium animalis* CNCM I-2494, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Lactobacillus casei* Shirota foram obtidas de forma comercial.

A metodologia adotada para a CIM (concentração inibitória mínima) dos extratos sob as diferentes linhagens bacterianas foi a microdiluição em placas de 96 poços. Seguiu-se o protocolo do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações.

3.6.2.1 Ativação dos Microrganismos

Os micro-organismos (anteriormente mantidos em meio condicionado e congelados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram transferidos para os caldos de crescimento. Para a *K. pneumoniae*, *S. typhi* e *E. coli* utilizou-se o caldo BHI, para a *S. aureus* o caldo Miller Hinton, já a *P. aeruginosa* em caldo soja tripticaseína. No caso das bactérias não patogênicas *B. animalis*, *L. acidophilus* e *L. casei* foi empregado a ativação em caldo MRS. Ambas bactérias foram incubadas por no mínimo 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao final do crescimento, com o auxílio de uma alça estéril as colônias foram repicadas em placas de

Petri contendo o ágar de crescimento correspondente ao caldo. E mais uma vez incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação as colônias foram distribuídas em tubos com solução salina (0,9% de NaCl) estéril, de forma a alcançar a turbidez de 0,5 da escala de McFarlland, correspondendo assim a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, procedeu-se a diluição destas soluções de bactérias em seus caldos correspondentes ao crescimento (MRS, BHI e Miller Hinton), no final com uma suspensão bacteriana de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL em cada poço.

O preparo e disposição nas microplacas de 96 poços se deram da seguinte forma: inicialmente, foram distribuídos 80 µL do caldo nutritivo em todos os poços; em seguida, aplicados 80 µL das amostras (EG9 e EG2) na concentração de 2000 µg/mL nos primeiros poços. A diluição se deu de maneira decrescente e seriada, de forma que no último poço a concentração da amostra fosse 0,976 µg/mL e no primeiro a concentração de 1000 µg/mL.

Ao final da diluição, adicionaram-se aos poços 20 µL da suspensão bacteriana, totalizando o volume final do poço em 100 µL. Ao final, a placa foi lacrada com tampa e incubada por 24 h em estufa a 37 °C.

Para a avaliação do crescimento ou inibição, passadas as 24 h de incubação, adicionou-se a cada poço 20 µL da solução reveladora (resazurina a 0,02%) e a microplaca foi reincubada por mais 3 h. Quando há o crescimento bacteriano a solução (anteriormente azul) torna-se rosa e permanece azul no caso de inibição do crescimento bacteriano.

Para maior credibilidade, os ensaios foram repetidos em triplicata, adotando-se o controle negativo para o crescimento, poços com apenas a presença caldo nutritivo (100 µL do meio em cada poço). Já para o controle positivo de crescimento apenas 80 µL do caldo e 20 µL da solução de bactérias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DA FARINHA LIOFILIZADA DO ESTIGMA DE MILHO

5.1.1 Composição proximal

A composição centesimal dos constituintes encontrados na farinha do estigma liofilizado demonstra bom valor nutricional. Estudo de Boen (2007) avaliou a composição centesimal de farinhas de milho e trigo comerciais, onde ambas apresentaram teor de proteínas próximas de 10% e 7,5%, respectivamente, valores estes próximos aos detectados no presente estudo para FEL ($8,53\% \pm 0,37$). Variações de composição de matrizes alimentares depende do tipo de solo, cultivar e do tempo da coleta. Observando o estudo de Kennedy e Burlingame (2003 apud JULIANO; VILLAREAL, 1993) viu-se valor médio de 8,8% de proteínas para os cultivares de arroz em diferentes regiões, com porcentual aproximado a FEL. Rahman (2014) afirma que cabelo de milho quando maduro (mais velho) possui o valor de 8,95% de proteína, corroborando com os dados detectados na pesquisa em tela.

Os teores de cinzas ($4,04\% \pm 0,25$) e carboidratos ($78,12\% \pm 0,02$) se mostram superiores quando comparados ao estudo de Kennedy e Burlingame (2003). Reforça-se ainda o baixo teor de lipídeos ($0,8478 \pm 0,0118$) desta farinha, que juntamente com a quantidade de minerais e carboidratos determinados torna essa matriz interessante do ponto de vista nutricional, podendo ser utilizada na alimentação. A FAO (2003) apresenta valores de 3,8% e 12% de gorduras e umidade, respectivamente, para a farinha de milho amarelo e 11% e 2,8% de gorduras e umidade, respectivamente, para a farinha de sorgo.

O valor de $8,46\% \pm 0,42$ para a umidade da FEL deixa-a em conformidade com a legislação para farinhas, onde o valor ideal é abaixo de 15% (BRASIL 2005). Ormenese (2010) também demonstrou valores inferiores a 15% na produção de farinhas de banana verde como forma de alimento não convencional.

5.1.2 Atividade de água

A atividade água (a_w) representa uma análise de importância no âmbito de tecnologia de alimentos, pois permite avaliar a susceptibilidade do alimento a deterioração, desta forma considerando como fator na vida de prateleira do produto (GARCIA 2004).

Para a FEL obteve-se o valor de 0,214 ($\pm 0,032$) de atividade de água. Pode-se assim considerar um resultado satisfatório, pois indica que a farinha é microbiologicamente estável, uma vez que possui a atividade de água menor que 0,60, valor que é considerado como limitante para viabilizar a multiplicação microbiana (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

5.1.3 pH

O parâmetro de pH é considerado um parâmetro de controle na viabilidade e qualidade de diversos alimentos, uma vez que influencia a destruição e multiplicação dos microrganismos neles presentes (SILVA, 2000).

O pH 5,60 ($\pm 0,01$) para a FEL, configura a farinha como pouco ácida e propícia para multiplicação de algumas bactérias no ponto de vista da segurança alimentar, embora os valores de pH próximos ao neutro (7,0) sejam considerados ótimos para o crescimento de diversos microrganismos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Algumas bactérias patogênicas conseguem se desenvolverem próximas ao pH 5,5; entretanto, a acidificação da mesma pode ser uma alternativa, deixando-a em um pH entre 4,0 e 4,5 favorecendo o crescimento quase que restrito de bactérias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* (ANJUM et al., 2014).

5.1.4 Perfil de açúcares

O cromatograma da corrida com o extrato da FEL, identificou 8 picos de açúcares, sendo possível a identificação de apenas seis e quantificação de quatro distintos, sacarose, lactose, glicose e xilose e dois outros com picos associados, frutose e arabinose, não sendo possível realizar a quantificação destes carboidratos isoladamente. Os valores demonstram que a sacarose apresenta uma maior proporção na amostra (9,81 $\pm 0,08$) mg/mL) sendo que a glicose (8,66 $\pm 0,03$ mg/mL) e xilose (8,09 $\pm 0,15$ mg/mL) também têm valores próximos, e a frutose + arabinose o valor de 24,25 $\pm 0,10$ mg/mL. Kereliuk (1995) identificou apenas a glicose, sacarose e frutose e rafinose em diferentes

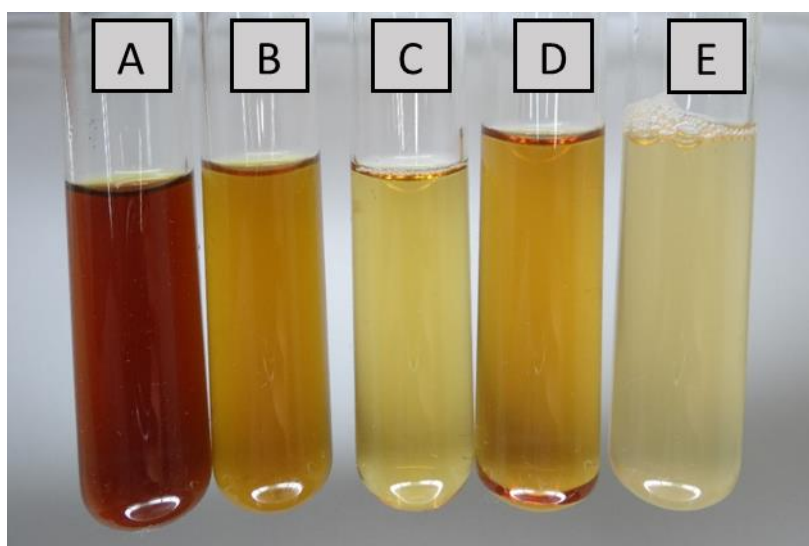
cultivares de milho. Embora não sendo comum em matrizes vegetais, a lactose foi identificada na amostra, entretanto não quantificada, estudo de Shanmugavelan (2013) também detectou lactose em matriz vegetal, no caso em folhas de chá verde.

Quando comparamos com outras farinhas como a integral e refinada de trigo, a exemplo de dados expostos por Zörb (2007), observamos que os açúcares identificados na FEL apresentam como diferencial a arabinose e lactose, agregando valor nutricional e aplicabilidade tecnológica.

5.2 EXTRATOS BRUTOS

Os extratos apresentaram variação de cor em uma escalada de marrom (Figura 5) bem como turbidezes diferentes.

Figura 5 - Extratos Brutos da farinha do estigma de milho liofilizado.



Tubo A: Tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 9,0 (EG9); Tubo B: Tampão fosfato de sódio anidro 0,1 mol. L⁻¹ pH 7,4 (EF); Tubo C: Água ultrapura (EA); Tubo D: Cloreto de sódio 0,15 mol. L⁻¹ (ES); Tubo E: Tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 2,0 (EG2). Fonte: Autor, 2020.

5.2.1 Proteínas da FEL

Tabela 3 – Concentração de proteínas solúveis e teor de nitrogênio total dos extratos brutos da farinha do estigma de milho liofilizado.

Proteínas solúveis – Bradford	
Extrato	mgP/MI
EG9	0,837
EG2	0,740
EA	0,084
ES	0,260
EF	0,258

EG9: extrato proteico em tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 9,0. EG2: extrato proteico em tampão glicina 0,1 mol. L⁻¹ pH 2,0. EA: extrato proteico em água ultrapura. ES: extrato proteico em cloreto de sódio 0,15 mol. L⁻¹. EF: extrato proteico em tampão fosfato de sódio anidro 0,1 mol. L⁻¹ pH 7,4. Fonte: Autor, 2019.

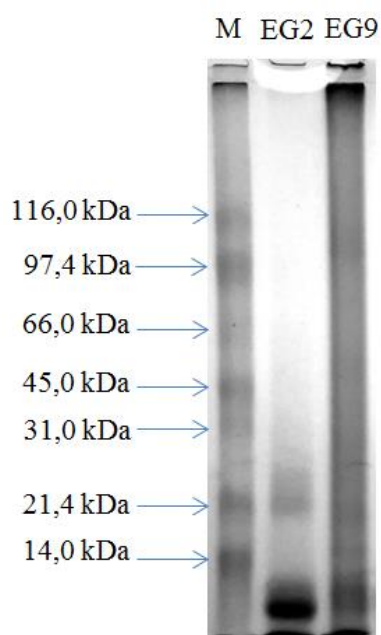
O teor de proteína solúvel obtido pelo método de Bradford (1976) demonstra uma variação para as diferentes amostras. Entretanto, devido à presença de pigmentos nas amostras, pode-se inferir que tais valores representem um falso negativo. Os valores diferenciados de proteínas solúveis variaram devido ao fato da influência direta com os polifenóis e polifenóis oxidases, pois tais compostos reagem com as proteínas de forma a gerar um complexo que impede a interação total da mesma com o corante empregado no método (MIWA, 2003). Ou seja, os teores de proteínas solúveis nos diferentes extratos gerados podem ser maiores devido a grande presença de polifenóis no cabelo de milho (MAKSIMOVIC, 2005).

Os extratos EG9 e EG2 foram o que apresentaram uma maior quantidade de proteína solúvel, enquanto o EA foi o que apresentou menor eficácia na extração (0,084 mgP/mL).

5.2.2 Perfil Eletroforético

O perfil eletroforético das amostras EG2 e EG9 (Figura 6) apresentou uma configuração distinta entre essas moléculas. O extrato EG2 exibiu duas bandas, uma próxima a 21,4 kDa e outra abaixo de 14 kDa. Já o extrato EG9, não apresentou boa visualidade, podendo apenas identificar uma banda mais marcada com peso molecular também abaixo dos 14 kDa.

Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS e β -mercaptoetanol.



Em cada poço foram aplicados 20 μ L de amostra na concentração de 4 mg/mL. No poço intitulado “M” encontra-se o marcador molecular, com as seguintes bandas: lisozima – 14,0 kDa, inibidor de tripsina da soja – 21,4 kDa, anidrase carbônica – 31,0 kDa, ovoalbumina – 45,0 kDa, albumina sérica bovina – 66,2 kDa, fosforilase B – 97,4 kDa, β -galactosidade – 116,0 kDa. Fonte: Autor, 2020.

5.3 COMPOSTOS ANTINUTRICIONAIS E/OU BIOTIVOS

5.3.1 De origem não proteica

Tabela 4 – Amido e fatores antinutricionais não proteicos avaliados na farinha do estigma de milho liofilizado.

COMPONENTES	AMOSTRAS				
	EG9	EF	EA	ES	EG2
Taninos	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+
Leucoantocianidinas	+	+	+	+	+
Flavonas, flavonóis e xantonas	+	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	-

+ (Reação positiva/detectado), - (Reação negativa/não detectado)

Fonte: Autor, 2020.

A análise dos resultados demonstra a presença de alguns fatores antinutricionais não proteicos, como os taninos, saponinas e leucoantocianidinas em todas as amostras, bem como as flavonas, flavonóis e xantonas.

Ao analisar a presença de taninos verificou-se uma pequena precipitação demonstrando a presença muito reduzida da coloração, não sendo possível diferenciar os taninos pirogálicos ou catéquicos, pois não ocorreu diferença em coloração azul ou verde e frente a coloração natural dos extratos.

A formação de espuma persistente demonstra a presença de saponinas nas amostras, o que justifica hemólises observadas ao testar a atividade frente hemácias, sendo a maior ocorrência no extrato EG2. Estudo de Fernandes (2012) também apontou hemólise frente a presença de saponinas em extratos de *Swartzia* spp.

Demais compostos fitoquímicos como flavonóis, xantonas e flavonas também de natureza fenólicas foram detectados em todos os extratos. Liu (2011) aponta que os fitoquímicos fenólicos presentes no cabelo do milho são em sua maioria flavonoides. Todos estes compostos haviam sido relatados para extratos etanólicos do cabelo de *Z. mays*; entretanto, a sua presença em extratos aquosos era até então desconhecida ou insuficiente (WANG, 2011; EBRAHIMZADEH, 2008; HASANUDIN, 2012). As presenças destes compostos estão diretamente ligadas à proteção da planta contra os ataques de possíveis patógenos, a exemplo dos taninos que conferem uma defesa contra fungos, bactérias e herbívoros, sendo estes responsáveis por conferir o sabor adstringente.

A ausência do amido nos diferentes extratos corrobora com o fato das plantas investirem este carboidrato em tecidos de reserva como o parênquima amilífero, sendo os estigmas ricos em tecidos apicais, especializados no crescimento e não na reserva de energia (ANGELO, 2005; CHAVES FILHO, 2008).

5.3.2 De origem proteica

A análise qualitativa de proteases por meio da hidrólise da gelatina demonstrou a ausência destas em todos os extratos avaliados, exceto para o EG2. As proteases estão associadas aos diversos tipos de atividades, bem como no processo de defesa, sinalização e percepção das plantas (VAN DER HOORN; JONES, 2004), e a sua ausência em matrizes vegetais com aplicações alimentícias não demonstra desvantagens. Contudo, quando detectadas em novas matrizes vegetais, se tornam

candidatas aos mais diferentes empregos industriais. Silva (2019) apresentou uma nova protease cisteínica isolada do vegetal *Calotropis procera* como uma candidata a produção de queijos. Soares (2015) também propôs a utilização de uma protease isolada da fruta-pão (*Artocarpus altilis*) como potencialidade biotecnológica na coagulação do leite. Torna-se então crescente a busca de novas fontes de proteases vegetais justamente pela sua capacidade de aplicabilidade tecnológica na indústria alimentícia (AHMED et al., 2010; JACOB et al., 2011).

Carlos (2017) já havia relatado a suposta presença de lectinas em extratos aquosos de estigmas de *Z. mays*, a qual apresenta hemaglutinação em eritrócitos de coelho. Os extratos EG9 e EG2 não demonstraram atividade hemaglutinante quando testados em sangue de frango e boi nativos e tratados com proteases. Martínez-Cruz (2001) detectou e purificou uma lectina do *Z. mays*, a partir da semente; entretanto, esta apresentou hemaglutinação frente a eritrócitos humanos, não avaliando-a com hemácias de outras espécies.

Embora possam desencadear quadros toxicológicos quando consumidas na sua forma ativa e inibir proteases, as lectinas quando submetidas ao processo de cozimento, acabam muitas vezes por sofrerem com o processo de desnaturação proteica, levando assim sua inativação (LACERDA, 2015; KNAUT, 2016).

5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.4.1 Atividade antibacteriana

Os extratos EG2 e EG9 não demonstraram inibição em nenhuma das concentrações avaliadas por meio desta metodologia empregada. Quando adicionada a solução reveladora de resazurina (cor inicialmente azul), os poços contendo as colônias bacterianas a solução mudou para a cor rosa. A mudança de cor é fruto da modificação da molécula, que na presença de células (metabolicamente viáveis) sofre oxirredução, gerando a resorufina, que apresenta cor rosa e emite fluorescência (OLIVEIRA, 2019).

Entretanto, embora os extratos avaliados não demonstrem capacidade bactericida, eles representam candidatos promissores para a aplicabilidade alimentícia, já que não inibiram o crescimento das cepas de bactérias ácido-láticas probióticas: *Bifidobacterium animalis* CNCM I-2494, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Lactobacillus casei* Shirota.

As bactérias ácido-láticas (BAL) representam um grupo diversificado de micro-organismos que estão diretamente associados a plantas, alimentos como carnes e leites, onde algumas são categorizadas como probióticas (BRUNO, 2011). Os probióticos são configurados como um ingrediente alimentar microbiano que ao serem consumidos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde (VANDENPLAS, 2015). As bactérias *B. animalis*, *L. acidophilus* e *L. casei* utilizadas neste trabalho são exemplos de probióticos, sendo responsáveis (quando administrados na quantidade e forma correta) por proporcionar efeitos benéficos à saúde, revertendo quadros de diarreia, cólicas, constipação e favorecendo uma melhor síntese de vitaminas (BEKKALI et al. 2007; CAPOZZI et al. 2012; VANDENPLAS, 2015).

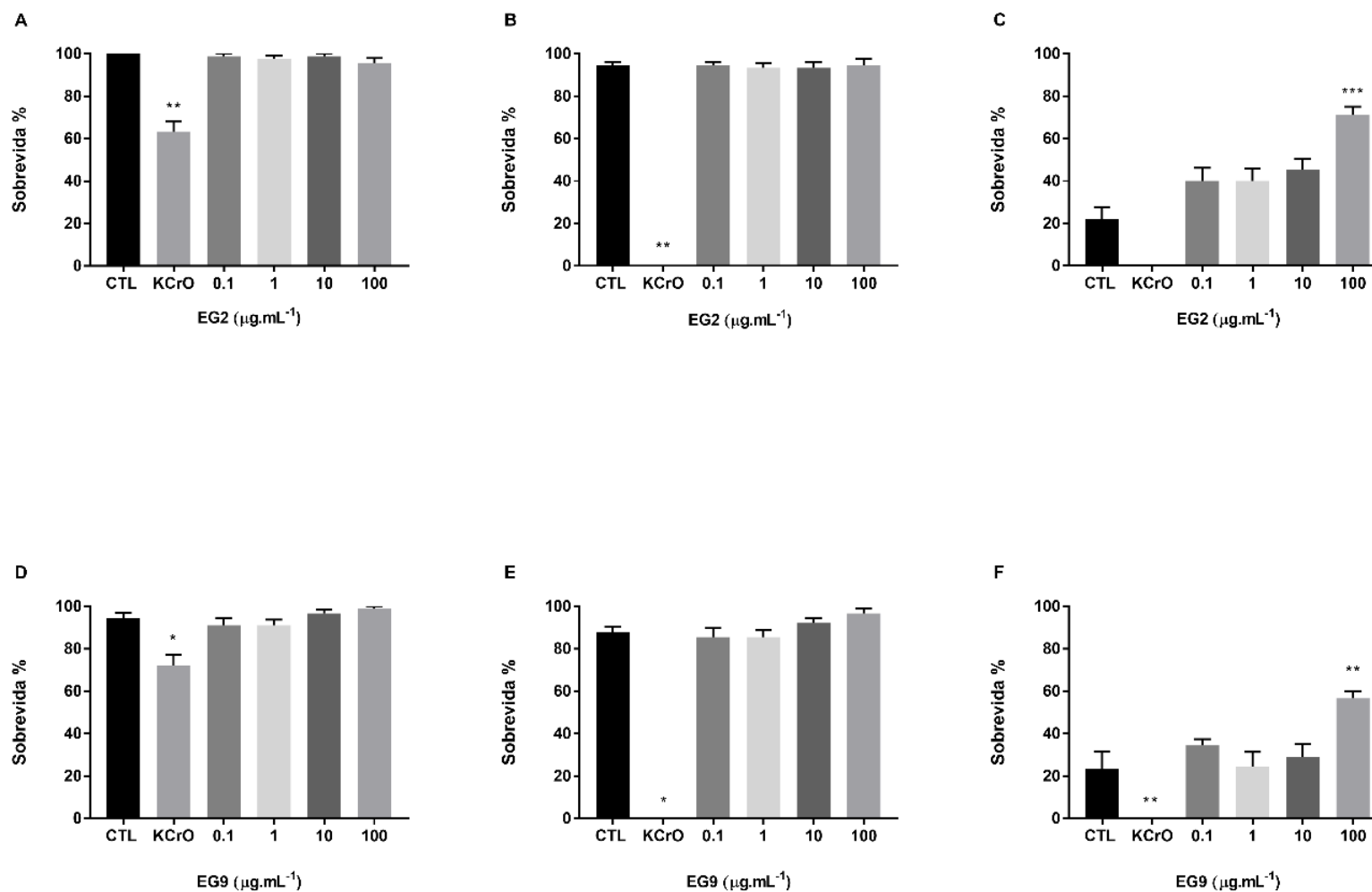
Na literatura encontram-se diversos relatos de extratos vegetais sendo associados a alimentos e probióticos, já que muitos fornecem substratos e condições ótimas para a multiplicação destes. Barcelos (2014) descreve o extrato da semente do gergelim como ótimo para o crescimento de probióticos comerciais. Já em relação ao emprego de alimentos não convencionais e funcionais, Balbi (2015) avaliou como satisfatória em sua pesquisa a introdução da farinha de banana e do albedo do maracujá na elaboração de queijo probiótico *petit suisse*.

5.4.2 Ensaio de toxicidade em *Artemia franciscana*

A *Artemia franciscana* é um micro crustáceo encontrado em águas salgadas, que ganhou espaço no meio científico sendo empregada em testes de toxicidade, substituindo outros modelos animais como ratos e coelhos, já que a espécie possui um pequeno tamanho, demanda pouca amostra para realização dos ensaios, além de ser de fácil manejo (BUENO; PIOVEZAN, 2015). Os ensaios de letalidade frente à *Artemia* é uma metodologia comumente empregada para avaliar o potencial tóxico de extratos de produtos naturais e substâncias isoladas (HIROTA, 2012).

As amostras utilizadas nos experimentos com *Artemia franciscana* não apresentaram diferença na sobrevivência das larvas de *A. franciscana*, após 24 e 48 h de exposição aos extratos, em relação ao grupo controle (Figura 7: A, B, D e E). No entanto, em 72 h foi observada uma redução da mortalidade das larvas na maior concentração testada (100 µg/mL), em comparação ao grupo controle e em ambos os extratos (Gráfico “C” para EG2 e “F” para EG9 da Figura 7). A sobrevivência dos náuplios expostos por 72 h a 100 µg/mL foi de 71,1 e 56,6% (extratos EG2 e EG9,

respectivamente); enquanto nos respectivos grupos controles, a sobrevivência das larvas foi de 22,2 e 23,3%. Não houve diferença na sobrevivência das larvas entre os tratamentos (EG2 versus EG9; 72 h).



Efeito dos extratos EG2 e EG9 na sobrevivência dos náuplios de *A. franciscana* em 24 (A e D), 48 (B e E) e 72 h (C e F) de exposição. KCrO - Dicromato de potássio (12,6 µg/mL). Os asteriscos representam a diferença em relação ao grupo controle (CTL). p < 0,05 (*); p < 0,010020(**); p < 0,001 (***); Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn (A, B, C, D e E); Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey (F). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média.

6 CONCLUSÃO

A farinha do estigma liofilizado do milho (FEL) quando avaliada em parâmetros nutricionais, é rica em proteínas, minerais e carboidratos, podendo-a compará-la a outras farinhas comercializadas e consumidas pelo homem. Sua ampla variedade de açúcares agrega ainda mais valores nutricionais.

Os fatores antinutricionais detectados não inviabilizam a utilização da farinha de estigma de milho como fonte alimentar, uma vez que foram detectadas baixas quantidades. Estudos com a atividade proteolítica devem ser executados mais detalhadamente a fim de elucidar as possíveis aplicações biotecnológicas.

Ademais, podemos concluir que em relação às atividades biológicas avaliadas:

- As frações proteicas EG2 e EG9 apresentam como promissoras para o emprego em alimento contendo probióticos, pois não induzem a mortalidade nas concentrações avaliadas.

- EG2 e EG9 não apresentam toxicidade frente a *A. franciscana*, indicando uma possível utilização como base alimentar.

7 REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) nº 12, sobre Alimentos e Bebidas**, 24 de julho de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78farinhas.htm>. Acesso em: 09 setembro de 2019.
- AHMED, I.A.M et al. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **Food Science and Technology**, v.43, p.1-6, 2010. Disponível em: Acesso em: 08 de janeiro de 2020. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.011
- ANGELO, P. C. S. Expressão gênica nos estigmas e estiletes de plantas da família Solanaceae: seqüências relacionadas com a patogênese. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 2, p. 177-184, 2005.
- ANJUM, N.; MAQSOOD, S.; MASUD, T.; AHMAD, A.; SOHAIL, A.; MOMIN, A. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. **Critical reviews in food science and nutrition**, 54(9), 1241-1251, 2014.
- AOAC. **Official Method of Analysis**.of AOAC. 16th ed.,1998.
- ARAÚJO, H. M. C. et al. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 23, n. 3, p. 467-474, 2010.
- JULIANO, B.; VILLAREAL, C. **Grain quality evaluation of world rices**. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 1993.
- BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M. M. A Manual Colorimetric Procedure for Measuring Ammonium Nitrogen in Soil and Plant Kjeldahl Digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 20, 961-969. 1989.
- BALADRIN, M. F.; KLOKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLINGE, W. H.; BALBI, P. V. T. **Petit suisse probiótico acrescido de farinha de banana verde e farinha do albedo de maracujá**. Rio Pomba, 2015.
- BARBOSA, A. S.; SOUSA, E. G.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, H. S. M. C.; MEDEIROS, M. B. X. Plantas medicinais: Aspecto do uso de fitoterápicos na melhoria da qualidade de vida humana. **Encontro de iniciação a docência**. UFPB-PRG; João Pessoa, Brazil: 2007.
- BARBOSA, P. P. S. **Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará)**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- BARBOSA, W.L.R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais, Belém - Pa: **Revista Científica da UFPA**, vol. 4, 2001.

- BARCELOS, S. C.; MORAES, G. M. D.; SILVA, L. M. F.; SALLES, H. O.; EGITO, A. S. Utilização de extrato aquoso das sementes de gergelim como substrato para o crescimento de bactérias lácteas probióticas. **Congresso Brasileiro de Mamona**, 6.; Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 3. Fortaleza, 2014.
- BARDOCZ, S.; BROWN, D. S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; STEWART, J. C.; PALMER, R. M. Effect of the beta-adrenoceptor agonist clenbuterol and phytohaemagglutinin on growth, protein synthesis and polyamine metabolism of tissues of the rat. **British journal of pharmacology**. 1992.
- BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; FRANKLIN, M. F.; CARVALHO, A. D. F. U. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**, 76(04), 613. 1996.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. (eds). **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2nd edition, Academic Press, London, 2004.
- BASTIEN, J.W. Pharmacopeia of qollahuayaandean. **J. Ethnopharmacol**, 8, 97–111, 1982.
- BEKKALI, N. L.; BONONGERS, M. E.; VAN DEN BERG, M. M.; LIEN, O.; BENNINGA, M. A. The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation: a pilot study. **Nutr J**. 2007.
- BOEN, T. R.; SOEIRO, B. T.; SOEIRO, E. R. P.; LIMA-PALLONE J., A. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.
- BOLDRINI, I. I.; LONGHI-WAGNER, H. M.; BOECHAT, S. C. 2005. Morfologia de taxonomia de gramíneas sul-rio-grandenses. **UFRGS Editora**, Porto Alegre, 94p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 263, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005. Seção 1, p.368-369.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa, 1ª ed, 2011.
- BRISSE, S.; GRIMONTAND, F.; GRIMONT, P. **The Genus *Klebsiella***. In: The Procaryotes. DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT. E. (Eds). Springer, p.159-196. 2006
- BRUNO, L. M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2011.

BUENO, A.; PIOVEZAN, M. **Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia**. IFSC, Santa Catarina. 2015. Disponível em: <http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202015%20/Ariele.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2018.

CAMPOS-VEGA, R.; GUADALUPE LOARCA-PIÑA; DAVE OOMAH, B. MINOR CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; DUENAS, M.T.; LÓPEZ, P.; SPANO, G. **Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products**. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;

CARDOSO, M. H. **Coração de bananeira em conserva: processamento e produto**. 2007. Patente número: PI0506651-4. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=679007&SearchParameter=CORA%C7%C3O%20DE%20BANANEIRA%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>>. Acesso em 08 abr. 2020.

CARLOS, L. E. ; ARAUJO, F. N. ; SARMENTO, T. A. B. ; GADELHA, C. A. A. ; SANTI-GADELHA, T. ; ABRANTES, V. E. F. . Atividade hemaglutinante do extrato aquoso dos estigmas de milho (*Zea mays*) sugere presença de lectina. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 1, p. 159-170, 2017.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao Chase, A.; Sendulsky, T. 1991. **Primeiro livro das gramíneas**: noções sobre a estrutura com exemplos da flora brasileira. Instituto de Botânica, São Paulo, 123p., 1991.

CHAVES FILHO, J. T. Variação sazonal de amido em tecidos de reserva do cafeeiro aarábica na fase reprodutiva. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz- piracicaba, 2008. chemicals. Source of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p.1054-1060, 1985.

CLAEYS, E.; DE SMET, S.; BALCAEN, A.; RAES, K. and DEMEYER, D. Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. **Meat Scienc**, 67,p. 281-288, 2004.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition M02-A10. v. 29, n. 1, 2009.

DERMASTIA, M.; KLADNIK, A.; KOCE, J. D.; CHOUREY, P. S. A cellular study of teosinte *Zea mays* subsp. *parviglumis* (*Poaceae*) caryopsis development showing several processes conserved in maize. **American Journal of Botany**, 96, 1798-1807, 2009.

DHUGGA, K. (2006). Maize Biomass Yield and Composition for Biofuels. **Crop Science**. 47. 10.2135/cropsci2007.05.0299.

DI STASI; L. C. Plantas Medicinais: **Arte e Ciência**. UNESP, Brasil, 1995, p. 230.

EBRAHIMZADEH, M. A.; MAHMOUDI, M.; AHANGAR, N.; EHTESHAMI, S.; ANSAROUFI, F.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Antidepressant activity of corn silk. **Pharmacology online**. 3, 647–652, 2009.

EBRAHIMZADEH, M. A.; POURMORAD, F.; HAFE, S. Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. **Turk. J. Biol.** 32, 43–49, 2008.

ENGLYST, H. N.; ANDERSON, V.; CUMMINGS, J. H. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 34(12), 1434–1440, 1983.

FERIOTTI, D. G. **Proposta de Aproveitamento do Pseudocaule da Bananeira (*Musa Cavendish*)**. 2010. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Engenharia de Mauá. São Caetano do Sul, 2010.

FERNANDES, A. V., **Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de *Fabaceae* da Amazônia**. Tese. Universidade Federal do Amazonas. 2012.

FERNANDES, G. S. **Bioprospecção Nutricional e Bioativa de sementes de dez espécies vegetais da caatinga**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará. 2011.

FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C.; NEUMANN, L. G.; KONZEN, P. H. A.; MORGANO, flavonoids from corn silk. **Int. J. Phys. Sci.** 5, 321–326, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497- 509, 1957.

FRANCO, R. C. **Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

KERELIUK, G. R.; SOSULSKI, F. W.; KALDY, M. S., Carbohydrates of North American corn (*Zea mays*), **Food Research International**, Volume 28, Issue 3, Pages 311-315, 1995.

GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granja de integração avícola** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 2009.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective, **Food Chemistry**, Volume 80, Issue 4, p. 589-596, 2003.

GOMES, A. S.; MAGNUS, K.; SOUZA, A. H., Riscos e Benefícios do Uso de Nutracêuticos para a Promoção da Saúde. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, vol.11, n.9, 2017.

GPWG (Grass Phylogeny Working Group). 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (*Poaceae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden** 88: 373-457. Handbook, 2005, p. 341 – 348.

HASANUDIN, K.; HASHIM, P.; MUSTAFA, S. (). Corn Silk (*Stigma Maydis*) in Healthcare: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Molecules**, 17(8), 9697–9715, 2012.

HIROTA, B. C. K. et al. Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.2, 2012.

HORN, D. S. Dicas Nutricionais – Propriedades Nutricionais do Maracujá, 14 de março de 2014.

HU, Q. L.; ZHANG, L. J.; LI, Y. N.; DING, Y. J.; LI, F. L. **Purification and anti-fatigue activity of Inglett**, G.E. Corn: Culture, Processing, Products; The AVI Publishing Company: Westport, CT, USA, 1970.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos. São Paulo: IAL, 2008, 1ª ed., p. 98-118.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 21-22. **International**, p. 461-482, 2009.

JACOB, M. et al. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.1, p.14-33, 2011.

JOHNSON, I. D.; OBST, J. M.; DAVIES, R. Observations on the use of lupin feeding or exogenous hormones to improve the reproductive performance of stud and commercial ewes in the southeast of South Australia. **Wool technology and sheep breeding**, v. 30, p. 23–30, 1982.

KELEN, M. E.B; NOUHUYS, I. S. V.; KEHL, L. C.; BRACK, P; SILVA D. B. **Plantas alimentícias não convencionais (PANCs):** Hortaliças espontâneas e nativas 1. ed. - Porto Alegre: UFRGS, 2015.

KNAUT, J. L. **Avaliação do efeito citotóxico de lectinas extraídas de leguminosas sobre células de glioma C6**. Florianópolis- SC, 2016.

KWAG, J. J.; LEE, J. G.; JANG, H. J.; KIM, O. C. Volatile components of corn silk (*Zea mays* L.). **Han’guk Sikp’um Yongyang Hakhoechi**, 12, 375-379, 1999.

LACERDA, J. T. J. G. **Atividade de inibição de protease da lectina de sementes de *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) e seus efeitos sobre *Ceratitis capitata*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita***. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

LI, B.; CUI, Z. K.; ZHAO, Y. C. Study on the preparation and composition of polysaccharide in corn silk. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 136, 34–36, 2008.

LIU, J.; LIN, S.; WANG, Z.; WANG, C.; WANG, E.; ZHANG, Y. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability. **Food Bioprod. Process**, 89, 333–339, 2011.

MACAGNAN, F. T. **Potencial Tecnológico e Nutricional de Subprodutos do Processamento de Frutas**. Santa Maria, RS, Brasil 2013.

MAKSIMOVIĆ, Z.; MALENČIĆ, Đ.; KOVAČEVIĆ, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877, 2005

MARTÍNEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - General Subjects, 1568(1), p. 37–44, 2001.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solidstate fermentation. A Review. **Biotechnology Advances**, 29, 365–373, 2011.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª ed. Fortaleza: EUFC, 1997

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v.15, n. 1, p. 104-111, 2013.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. Dissertação de mestrado , SÃO CARLOS, 2003.

MONTEIRO, J. S. **CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS E NUTRICIONAIS DOS PÃES ISENTOS EM GLÚTEN: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA** / Jordanna Santos Monteiro; orientador Wilma Maria Coelho Araújo. Brasília, 2017. 177 p. Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nutrição Humana) Universidade de Brasília, 2017.

MOURA N. S.; VASCONCELOS A. C. M.; BERNABÉ, B. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaio Toxicológicos: Um Estudo Sobre A Utilização De Testes In Vivo E In Vitro. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.15; 2012.

NOJOSA, G. B.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin as a defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p.1737-1747, 2004.

NUNES, C.M. A. C. **Conhecimento popular sobre plantas medicinais para o tratamento de sintomas climatéricos em Ouro Preto, Minas Gerais**. Monografia, Universidade Federal de Ouro Preto. 2019.

OLESZEK, W. A.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002 – 2005). **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 78 – 91, 2006.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J. T. A.; RIOS, F. J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; OLIVEIRA, R. D. **Análise do Comportamento de Células Tumorais Pulmonares A549 em Contato com Scaffold Biológico**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia – MG, Brasil. 2019.

OLIVEIRA, R.P. **Estudos taxonômicos, filogenéticos e biosistemáticos em *Raddia Bertol.* (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae)**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. p. 27–135, 1987, 2006.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347 – 352, 1995.

POOVAN, S.; SU, Y. K.; JUNG, B. K.; HEON, W. K.; SOO, M. C.; SE, N. K.; SO, Y. K.; YOUNG, S. C.; HAENG, R. K. Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD, **Carbohydrate Research**, v. 380, 2013, 112-117.

POSSE, J. C. **Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do SUS nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: uma abordagem etnobotânica/** Juliana Costa Posse. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2007.

PRICE, K. R.; JOHNSON, I. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance Rahman, N. A., & Wan Rosli, W. I. Nutritional compositions and antioxidative capacity of the silk obtained from immature and mature corn. *Journal of King Saud University - Science*, 26(2), **Research Reviews**, v. 6, p. 209–236, 1993, 2014.

RISPAIL, N.; NASH, R.; WEBB, K. J. **Secondary metabolite profiling**. *Lotus japonicus* SALVI, R. M.; MAGNUS, K. Interação Fármaco-Nutriente: desafio atual da farmacovigilância. 1. ed. Porto Alegre: Edipucrs, 2014. p. 152

SILVA, A. A.; BARBOSA JUNIOR, J. L.; BARBOSA, M. I. M. J. Farinha de banana verde como ingrediente funcional em produtos alimentícios. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 12, p. 2252-2258, dez. 2015.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

SILVA, M. Z. R. **Potencial biotecnológico de uma protease cisteínica do látex de *Calotropis procera* para produção de queijo**. 2019. 100 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SKOOG D. A.; WEST, D. M.; HOLLER F. J.; CROUCH S. R.. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9th. 2014.

SOARES, E. F. et al . Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 1, p. 149-154, 2015.

SOARES, N.; SANTOS, P.; VIEIRA, V.; PIMENTA, V.; ARAÚJO, E. TÉCNICAS DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E SUA IMPORTÂNCIA PARA O ESTUDO DE BIOMOLÉCULAS DERIVADAS DE PLANTAS. **Enciclopédia Biosfera**. 13. 991-1010. 10.18677/EnciBio_2016B_094. 2016.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests—a critical analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 2, n. 3-4, p. 249-255, 1978.

STEUER, M. K.; BEUTH J.; HOFSTÄDTER F.; PRÖBSTER L.; KO, H. L.; PULVERER. G.; STRUTZ, J. Blood group phenotype determines lectin-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human outer ear canal epithelium. **Zentralbl Bakteriologie**. Apr;282(3):287-95, 1995

TAO, F.; YOKOZAWA, M., XU, Y., HAYASHI, Y.; ZHANG, Z. Climate changes and trends in phenology and yields of field crops in China 1981-2000. **Agricultural and Forest Meteorology**, 138, 82-92, 2006.

VAN DER HOORN, R. A.; JONES, J. D. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, 7(4), 400–407. 2004.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. 2015.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, 44(4). 2004.

VOGEL, S. S. et al. Calcium influx is required for endocytotic membrane retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 5019-5024, 1999

WANG, C., ZHANG, T., LIU, J., LU, S., ZHANG, C., WANG, E.; LIU, J. Subchronic toxicity study of corn silk with rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 137(1), 36–43, 2011.

WATSON, A. A.; FLEET, G. W. J.; ASANO, N.; MOLYNEUX, R. J.; NASH, R. J. Willis, Kathy J. State of the world's plants report-2017. **Royal Botanic Gardens**, 2017.

WILSON, E.O. (2012) **Diversidade da vida**. São Paulo: Companhia das Letras.

Yesilada, E.; Honda, G.; Sevik, E.; Tabata, M.; Fujita, T.; Tanaka, T.; Takeda, Y.; Takaishi, Y. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. **J. Ethnopharmacol.**, 46, 133–152. 1995.

ZOPOLLATTO, M. **Produtividade, composição morfológica e valor nutritivo de cultivares de milho (*Zea mays* L.) para produção de silagem sob os efeitos da maturidade**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.

ZOPOLLATTO, Maity. Produtividade, composição morfológica e valor nutritivo de cultivares de milho (*Zea mays* L.) para produção de silagem sob os efeitos da maturidade. 2007. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura

Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. doi:10.11606/T.11.2007.tde-02082007-084330. Acesso em: 2020-04-13.

ZÖRB, C.; BETSCHE, T.; LANGENKÄMPER, G.; ZAPP, J.; SEIFERT, M. Free sugars in spelt wholemeal and flour. **Journal of Applied Botany and Food Quality**. 81. 172 – 174. 2007.

ZULKIFLI, S. Z .et al. Nauplii of brine shrimp (*Artemia salina*) as a potential toxicity testing organism for heavy metals contamination. In: **From sources to solution**. Springer, Singapore, p. 233-237. 2014.