



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
CAMPUS PATOS DE MINAS



LUDMILLA JANNE CARVALHO FERREIRA

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DE ÓLEO DE MILHO

PATOS DE MINAS

2019

LUDMILLA JANNE CARVALHO FERREIRA

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DE ÓLEO DE MILHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia - *Campus* de Patos de Minas como parte dos requisitos para conclusão do curso.

Orientadora: Prof^a Dr^a Liliane Maciel de Oliveira
Co – orientadora: Prof^a Dr^a Líbia Diniz Santos

PATOS DE MINAS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Engenharia Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG,
CEP 38400-902

Telefone: (34) 3239-4285 - secdireq@feq.ufu.br - www.feq.ufu.br



HOMOLOGAÇÃO 14/2019/FEQUI

LUDMILLA JANNE CARVALHO FERREIRA

Extração de proteínas e compostos fenólicos do resíduo do processamento de óleo de milho

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado nesta data para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - *campus* Patos de Minas (MG) pela banca examinadora constituída por:

Prof.^a Dr.^a Liliane Maciel de Oliveira
Orientador(a) - UFU

M.^a Laís Cristina Ferreira Sousa
UFU

Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes
UFU

Patos de Minas, 11 de julho de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Liliane Maciel de Oliveira, Presidente**, em 11/07/2019, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lais Cristina Ferreira Sousa, Membro de Comissão**, em 11/07/2019, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Souza Gomes, Membro de Comissão**, em 11/07/2019, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1330122** e o código CRC **FCA22B54**.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DE ÓLEO DE MILHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do título de Bacharel no curso
de Engenharia de Alimentos da Universidade
Federal de Uberlândia - *Campus* de Patos de
Minas, pela banca examinadora, formada por:

Patos de Minas, 11 de julho de 2019.

Prof^ª. Dr^ª Liliane Maciel de Oliveira – UFU/MG

Prof^º. Dr^º. Marcos de Souza Gomes – UFU/MG

M.^a Lais Cristina Ferreira Sousa – UFU/MG

À minha mãe Alaene, minha irmã Milaine e a todos os familiares e amigos que com tanto carinho e apoio, tanto contribuíram para que este sonho se realizasse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado até aqui, pelas oportunidades e por todas as boas pessoas que colocou em meu caminho.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Liliane Maciel de Oliveira e co-orientadora Prof^a Dr^a Líbia Diniz Santos pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por toda dedicação, o apoio e ensinamentos.

Agradeço ao grupo PET Engenharia de Alimentos, por todas as pessoas maravilhosas, por todos os momentos de aprendizado e superação, por me proporcionar crescimento profissional, amadurecimento e tantas alegrias. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Danylo, por ter sido um tutor tão atencioso, gentil e dedicado.

Agradeço a minha mãe Alaene, pelo amor e por todo o esforço dedicado a mim, por estar ao meu lado em todos os momentos, por me dar apoio e me transmitir a força necessária para que este momento se tornasse possível. Agradeço a minha irmã Milaine, meus avós Soni e José Donizete, meu tio Welcio e meu namorado Elizon, por sempre estarem ao meu lado, por valorizarem cada conquista e me incentivarem a ir cada vez mais longe.

Por fim, agradeço aos meus amigos que participaram das alegrias, conquistas, dificuldades e superações, ajudando a manter os dias mais prazerosos com os cafés e as boas conversas, e a todos que participaram de forma direta ou indireta para a minha formação.

RESUMO

O resíduo obtido no processamento de óleo de milho, composto pelo gérmen com pericarpo desengordurado, possui em sua composição proteínas, fenólicos e fibras. Além de estudos envolvendo sua utilização para alimentação animal, estes resíduos possuem importância relacionada aos compostos bioativos presentes em resíduos de fontes vegetais, assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de extração de compostos fenólicos totais e proteínas presentes neste resíduo a partir de extração com solventes. A amostra do resíduo passou por dois tipos de secagem: em estufa a vácuo (60°C) e liofilização. Foram realizadas extrações sólido-líquido, utilizando solventes eutéticos profundos formados por cloreto de colina com glicerol (ChCl:Gli) e acetato de sódio com glicerol (Ac:Gli) nas proporções molares 1:1 e 1:2, que foram comparados com solventes aquosos de etanol alcalino (EA) (50 e 65% v/v), utilizando a fração sólido/líquido de 1:15 (m/v), a 50°C por 2 horas. Após este procedimento foram realizadas análises de quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e de proteínas pelo método BCA dos extratos. Para as extrações de proteínas o solvente ChCl:Gli usando amostra liofilizada apresentou melhor desempenho que as extrações utilizando solvente Ac:Gli, resultando em extrações de $8,01 \pm 0,51$ g/100g ROM e $5,42 \pm 0,14$ g/100g ROM respectivamente. Apenas a razão molar influenciou nas extrações com Ac:Gli, onde o maior resultado foi obtido para razão molar (1:2). As medidas de proteínas dos extratos etanólicos resultaram em valores incoerentes, possivelmente pela extração de outros componentes da amostra que interferiram nas análises. Para a extração de compostos fenólicos os solventes eutéticos com maiores frações molares de glicerol apresentaram melhores resultados e foram semelhantes ao obtido com etanol alcalino 65%. Foram obtidos $33,34 \pm 2,61$ mg EAG/g ROM para o ChCl:Gli (1:2), $33,90 \pm 2,25$ mg EAG/g ROM para o Ac:Gli (1:2) e $29,55 \pm 9,13$ mg EAG/g ROM para EA 65%. O estudo mostrou que é possível extrair e recuperar compostos com valor agregado do resíduo da produção de óleo de milho utilizando solventes eutéticos profundos e solução etanólica alcalina.

Palavras chaves: Compostos fenólicos; Proteínas vegetais, Extração sólido-líquido, Resíduos agroindustriais; Solventes Eutéticos Profundos.

ABSTRACT

The residue obtained by the corn oil processing, composed of germ with defatted pericarp, has in its composition proteins, phenolics and fibers. Besides studies involving their use for animal feed, these residues have importance related to bioactive compounds present in residues from plant sources, thus, this work aimed to evaluate extraction processes of total phenolic compounds and proteins present in this residue using solvent extraction. The sample went through two types of drying processes: in a vacuum oven (60°C) and lyophilization. Solid-liquid extractions were performed using deep eutectic solvents formed by glycerol and choline chloride (ChCl: Gly); and by glycerol and sodium acetate (Ac: Gly) at 1: 1 and 1: 2 molar ratios, which were compared with aqueous alkaline ethanol solutions (EA) (50 and 65% v / v) using the solid / liquid fraction of 1:15 (m / v) at 50 ° C for 2 hours. After this procedure, quantification of total phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method and proteins by the BCA method of the extracts were performed. For protein extractions ChCl:Gly solvent using lyophilized sample presented better performance than Ac:Gly solvent extractions, resulting in extractions of 8.01 ± 0.51 g/100g ROM and 5.42 ± 0.14 g/100g ROM respectively. Only the molar ratio influenced the extractions with Ac:Gly, where the highest result was obtained for the molar ratio (1:2). Protein measurements of ethanolic extracts resulted in incoherent values, possibly by the extraction of other components from the sample that interfered in the analyzes. For the extraction of phenolic compounds, the eutectic solvents with higher molar fractions of glycerol presented better results and were similar to those obtained with alkaline ethanol 65%. It was obtained 33.34 ± 2.61 mg EAG/g ROM for ChCl:Gly (1:2), 33.90 ± 2.25 mg EAG/g ROM for Ac:Gly (1:2) and $29, 55 \pm 9.13$ mg EAG/g ROM for EA 65%. The study showed that it is possible to extract and recover value-added compounds from the corn oil production residue using deep eutectic solvents and alkaline ethanolic solution.

Keywords: Phenolic compounds; Vegetable proteins; Solid-liquid extraction; Agroindustrial residues; Deep Eutectic Solvents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais partes do grão de milho.....	14
Figura 2 – Fórmula estrutural do cloreto de colina.....	17
Figura 3 - Estrutura típica dos compostos fenólicos.....	19
Figura 4 - Mecanismo de ressonância que mantém a estabilidade do anel.....	20
Figura 5 - Concentração de proteína no extrato após 2 horas de extração com diferentes solventes.....	23
Figura 6 - Concentração de compostos fenólicos totais no extrato após 2 horas de extração com diferentes solventes.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Ácetato de sódio
BCA	Ácido Bicinchonínico
ChCl	Cloreto de colina
CODH	Composto Orgânico Doador de Hidrogênio
EA	Etanol Alcalino
EAG	Equivalente ao ácido gálico
Gli	Glicerol
ROM	Resíduo do Processamento de Óleo de Milho
ROME	Resíduo do Processamento de Óleo de Milho seco em Estufa à Vácuo
ROML	Resíduo do Processamento de Óleo de Milho Liofilizado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1	Resíduos do processamento do milho e seu aproveitamento.....	14
3.2	Solventes Eutéticos Profundos.....	16
3.3	Proteínas obtidas de resíduos vegetais	18
3.4	Compostos fenólicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Preparo da amostra	21
4.2	Preparo dos solventes	21
4.3	Extrações.....	21
4.4	Proteínas totais	22
4.5	Fenólicos totais	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1	Extração de proteínas	23
5.2	Extração de Fenólicos Totais	25
6	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais são definidos como produtos de várias indústrias de processamento de alimentos que não fazem parte do produto final e não foram utilizados para outros fins. Podem ser classificados como sendo de fonte animal ou vegetal, como resíduos de frutas e vegetais, cereais, oleaginosas, raízes e tubérculos, produtos à base de carne, peixe e marisco e produtos lácteos (JIN et al., 2018). Esses resíduos podem ser gerados em diversas etapas do processamento, como, por exemplo, através de processos que separam o produto de valor dos demais constituintes da planta ou do animal (BALASUNDRAM et al., 2006).

Dos resíduos alimentares produzidos cerca de 63% são provenientes de fontes vegetais. Esses subprodutos são uma importante fonte de carboidratos, lipídios, proteínas, minerais, além de serem ricos em compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos. Isso confere a eles um grande potencial como fontes de compostos de alto valor agregado e podem ser usados como ingredientes naturais (JIN et al., 2018).

A indústria tem buscado alternativas para minimizar o desperdício de alimentos e consequentemente a geração de resíduos, já que no setor de processamento vegetal esses podem até mesmo exceder a massa do produto de interesse (AYALA-ZAVALA et al., 2011). Com objetivo de melhorar a sustentabilidade dos processos e promover a conservação de recursos naturais, outras formas de aproveitamento desses resíduos além das tradicionais utilizações na produção de ração animal e fertilizantes têm sido estudadas (JIN et al., 2018).

Dentre as opções para maior valorização desses resíduos estão a produção de ingredientes alimentícios de valor agregado, produtos químicos e biocombustíveis (JIN et al., 2018). A biomassa lignocelulósica representa uma fonte importante de compostos subutilizados. Essa biomassa pode ser utilizada para obtenção de bioenergia, como o bioetanol e o biodiesel, usados como substituição parcial dos combustíveis fósseis. Entretanto, a sua obtenção a partir desses resíduos de processamento de alimentos, principalmente os agroindustriais, pode ser mais onerosa do que a partir de plantações criadas para esse fim, das quais pode se obter a matéria prima diretamente fermentescível (DE CORATO et al., 2018).

O interesse por moléculas bioativas obtidas de vegetais tem crescido nas últimas décadas devido à descoberta de novas fontes, como os resíduos agroindustriais (MARTINS; FERREIRA, 2017). De acordo com Ayala-zavala et al. (2011) os subprodutos de frutos tropicais contêm altas concentrações de várias substâncias que proporcionam benefícios à saúde e podem ser extraídas para fornecer produtos alimentícios nutracêuticos.

Alguns ingredientes obtidos a partir de plantas, frutas e vegetais são comumente chamados de fitoquímicos devido aos inúmeros efeitos biológicos que apresentam. Dependendo da concentração utilizada as moléculas bioativas podem proporcionar efeitos profiláticos e terapêuticos, agirem como corantes e até mesmo conservantes de alimentos por meio das ações antioxidantes e antimicrobianas que possuem. Tais características melhoram a aparência e as propriedades nutricionais dos alimentos, agregando valor aos mesmos (MARTINS; FERREIRA, 2017).

Existem muitos estudos na literatura que avaliaram a extração de compostos bioativos a partir de resíduos agroindustriais. O bagaço de uva proveniente do processo de obtenção de vinho foi utilizado por Botti (2016) para extrair o resveratrol, composto que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e atividade anti-neoplásica, além de causar efeito protetor cardiovascular. Dos subprodutos do processamento de sementes de girassol foram extraídos flavonoides, que possuem importante ação antioxidante (SOUZA, 2013). Os resíduos do processamento do milho, como a casca, são ricos em celulose, hemiceluloses e extrativos (dos quais estão inclusos os compostos fenólicos) (EVANGELISTA, 2017).

No processo de obtenção de óleo de milho se faz necessário promover a degerminação do grão, etapa na qual o endosperma amiláceo é separado por maceração ou atrito. Desta forma, obtém-se a fração gérmen com pericarpo que então é submetida à extração de lipídeos, pelos processos de prensagem ou com o uso de solventes. O resíduo desse processamento é a fração gérmen com pericarpo desengordurado, que possui em sua composição proteínas, fenólicos e fibras (CASTRO et al., 2011).

O processamento de milho no Brasil atinge uma grande escala e por isso gera grande quantidade de resíduo. Por ser um resíduo aplicado principalmente na alimentação animal e pouco estudado para aplicações na alimentação humana, outras formas de aproveitamento devem ser estudadas, de forma a obter produtos de maior valor agregado. Por isso, este estudo teve como objetivo principal avaliar a extração de compostos fenólicos totais e proteínas utilizando solventes eutéticos profundos (DES – “Deep Eutetic Solvents”) e compará-los com a extração realizada com solução aquosa de etanol, que é um solvente comumente utilizado em processos de extração de compostos de matrizes vegetais.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o processo de extração de compostos fenólicos totais e proteínas presentes no resíduo formado na produção de óleo de milho a partir de extração com solventes. Os objetivos específicos foram:

- 1- Comparar a eficiência da extração de proteínas e fenólicos do resíduo estudado utilizando solventes eutéticos profundos e solução aquosa de etanol;
- 2- Avaliar o efeito do preparo da amostra e da composição do solvente na extração.

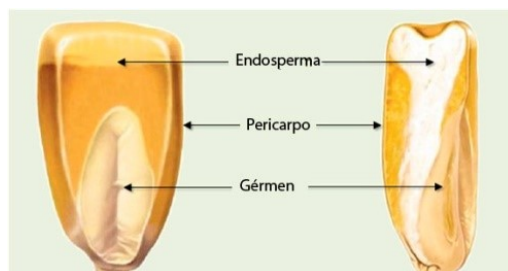
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Resíduos do processamento do milho e seu aproveitamento

O milho é uma das culturas mais tradicionais do mundo, sendo produzido em quase todos os continentes (DANTAS, 2013). Em 2015 a produção mundial foi estimada em 1026 milhões de toneladas, com os Estados Unidos, China e Brasil apontados como os principais países produtores (JIN et al., 2018).

O milho é tradicionalmente usado como alimento humano ou ração animal (JIN et al., 2018). A sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo. É formado por três principais estruturas físicas: endosperma, gérmen e pericarpo (casca), conforme apresentado na Figura 1. O endosperma representa 82% da massa total e é composto por 86,4% de amido e 9,4% de proteína. O gérmen, que representa 12%, possui 34,5% de lipídios, 18,8% de proteína, 10,1% de cinza, 10,8% de açúcares simples e 8,2% de amido. O pericarpo representa apenas 6% do peso seco do grão e contém 7,3% de amido, 3,7% de proteína e 1,0% de lipídios (J. ANDERSON; LAMSAL, 2011). Todas essas composições podem variar de acordo com a com a influência de fatores genéticos, condições climáticas e fertilização (RICHARD KWIATKOWSKI; CHERYAN, 2002).

Figura 1 - Principais partes do grão de milho.



Fonte: Sousa (2018).

Cada componente do grão de milho contém proteínas em tipos e quantidades diferentes (J. ANDERSON; LAMSAL, 2011). O endosperma contém prolaminas zeínas (60%), responsáveis por formar a matriz proteica que envolve os grânulos de amido, glutelinas (26%) e albuminas e globulinas (6%). O gérmen contém principalmente albuminas (30%) e globulinas (30%), mas também glutelinas (23%) e prolaminas (5%) (SANTOS et al., 2014). Devido a sua variedade e ao perfil aminoácido, as proteínas presentes no gérmen possuem melhor qualidade nutricional em relação às proteínas do grão inteiro (CASTRO et al., 2011).

A maior quantidade dos fenólicos (98,9%) encontra-se na fração insolúvel em água, enquanto a maior diversidade química é encontrada na fração solúvel e está diretamente relacionada com a cor do grão, que apesar de ser geralmente amarelo ou branco, pode apresentar colorações que variam desde o preto até o vermelho (EMBRAPA, 2006). Os compostos fenólicos presentes no grão de milho são as aminas fenólicas, alguns flavonoides e principalmente os ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos presentes em maior quantidade são o ferúlico e o p-cumárico, que podem estar presentes nas suas duas formas isoméricas, sendo a trans a mais comum. Esses ácidos estão presentes na forma solúvel ou ligados aos componentes da parede celular. O ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico) é o mais abundante na parede celular das monocotiledôneas, sendo encontrado em todo o grão de milho, mas é mais abundante no pericarpo e na camada de aleurona (SALINAS-MORENO et al., 2017).

Na alimentação humana o milho pode ser utilizado na forma de grãos secos e verdes. Os grãos secos podem sofrer processamentos por via seca ou úmida. Na via seca os grãos são quebrados em gérmen, pericarpo e endosperma para originar produtos como as farinhas, fubá, farelo, extrusado e óleo refinado. Já no processo por via úmida é realizado a maceração dos grãos utilizando uma solução de dióxido de enxofre que possibilita a separação dos componentes do grão, como amido e proteínas (REGITANO-D'ARCE et al., 2015). Os resíduos do processamento do milho têm composição que variam de acordo com cada produto. Dentre os resíduos gerados estão bagaços, palhas, cascas, a milhocina, que é a água utilizada no processamento por via úmida na etapa de maceração na produção de amido de milho e a torta proveniente da extração de óleo (LOSS, 2009).

Resíduos do processamento do milho têm sido utilizados para a extração de compostos com propriedades bioativas e/ou tecnológicas. Silvério (2013) realizou a extração de nanocristais de celulose a partir de sabugo de milho, para utilizar como agente de reforço em nanocompósitos poliméricos. Delgado-Aguilar et al. (2018) avaliaram a viabilidade técnica e a qualidade das fibras extraídas da palha de milho aplicadas como reforço em polipropileno, com o objetivo de obter uma fonte barata, como alternativa de substituição das fibras de vidro.

O Brasil é o quarto produtor mundial de óleo de milho, com 93.797 toneladas produzidas em 2013 (ACTUALIX, 2016). O resíduo gerado na produção do óleo de milho é proveniente da prensagem, que é composto basicamente pela casca do milho (pericarpo) e gérmen desengordurado. A maioria dos estudos relacionados a esse resíduo são voltados para sua utilização em ração animal. Moreira et al. (2002) estudaram a viabilidade de utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos e verificaram que a

inclusão de níveis crescentes desse farelo nas rações de suínos, na fase de crescimento e terminação, leva à piora no desempenho dos animais e ainda, que a inclusão de 15% do farelo na ração só é viável se o preço do farelo for 80% do preço do milho. Brunelli (2014) estudou a utilização do farelo de milho desengordurado na alimentação de frangos de corte e observou a possibilidade da inclusão de 20% desse farelo na ração sem efeito negativo nas características de desempenho e de carcaça. Além disso, outros estudos já têm buscado alternativas para a utilização desse resíduo na alimentação humana. Froes et al. (2012) estudaram a utilização do gérmen com pericarpo de milho desengordurado na produção de biscoitos tipo *cookie* e verificaram que até 17% pode ser utilizado na formulação dos biscoitos para que estes apresentem boa aceitação e qualidade nutricional, sobretudo por conter alto teor de fibra alimentar. Entretanto, não foi encontrado na literatura estudos de extração de outros componentes de interesse industrial deste resíduo. Por isso pretende-se avaliar neste estudo o processo de extração com solventes orgânicos e eutéticos das proteínas e fenólicos presentes neste resíduo.

3.2 Solventes Eutéticos Profundos

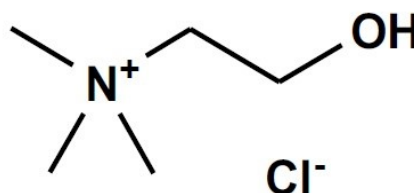
Os DES são formados a partir da mistura de sais de haletos orgânicos com um composto orgânico doador de hidrogênio (CODH), tais como aminas, amidas, álcoois e ácidos carboxílicos. Podem ser facilmente preparados a partir de uma proporção molar adequada dos componentes submetida aos processos de aquecimento, liofilização ou moagem, sendo o aquecimento de 80 a 100°C com agitação o mais utilizado (HUANG et al., 2019). Os componentes não formam ligações iônicas ou covalentes e interagem através de ligações de hidrogênio que dão origem a uma mistura com o ponto de fusão mais baixo do que o de cada componente individual (DIAS, 2016). Esses solventes, análogos aos Líquidos Iônicos, apresentam vantagens exclusivas, tais como: baixo custo, baixa ou nenhuma toxicidade, biocompatibilidade, biodegradação, menores pressões de vapor e boa capacidade de recuperação (HUANG et al., 2019; SMITH et al., 2014).

Surgiram como solventes promissores como alternativa aos compostos orgânicos voláteis comumente usados como solventes, já que estes últimos são compostos de baixo peso molecular e derivados petroquímicos e álcoois, que apresentam desvantagens intrínsecas, como volatilidade, alta inflamabilidade, toxicidade e, em muitos casos, não biodegradabilidade (LONGO JR.; CRAVEIRO, 2018).

Os DES possuem toxicidade estritamente relacionada com a sua composição. Apesar de existir a possibilidade da utilização de sais metálicos em sua composição, uma grande variedade pode ser formada utilizando sais orgânicos como o ChCl combinados com polióis como a ureia, glicerol, etilenoglicol, frutose e eritritol, apresentando baixa ou nenhuma toxicidade inerente. Estas características conferem a eles a possibilidade de serem usados em ingredientes de qualidade alimentar e a denominação de solventes “verdes” por não causarem danos ao meio ambiente (SMITH et al., 2014).

Devido a sua estrutura e ampla faixa de polaridade, os DESs tem uma boa capacidade para dissolver pequenas moléculas de produtos naturais, e também macromoléculas, como DNA, glúten e amido. Os mais investigados e aplicados são os DESs baseados em cloreto de colina (Figura 2), um sal barato, biodegradável, biocompatível e não tóxico, que pode ser extraído de fontes de biomassa ou sintetizado a partir de reservas fósseis. Os DESs baseados em ChCl são apropriados para aplicações em que um determinado pH é necessário, já que quando o CODH é um ácido orgânico, ácido inorgânico, amina ou álcalis, o DES formado exibirá acidez ou alcalinidade que pode ser controlada alterando a razão molar do componente (HUANG et al., 2019).

Figura 2 – Fórmula estrutural do cloreto de colina.



Fonte: Huang et al., 2019

Dependendo da proporção molar utilizada e principalmente da viscosidade do próprio CODH, a adição de água aos DESs pode ser realizada, a fim reduzir a viscosidade dos solventes e melhorar a transferência de massa das moléculas bioativas das matrizes naturais (VIEIRA et al., 2018). Entretanto, a diluição dos DESs na água ou sua síntese na presença de água pode levar à perda da ligação de hidrogênio, e consequentemente, no desaparecimento da estrutura espacial do DES. Por esse motivo, estudos são realizados a fim de determinar a fração de água ideal para cada DESs (DIAS, 2016). Outra condição que é utilizada para contornar a alta viscosidade é o aumento da temperatura, que tornam os solventes mais fluidos e consequentemente levam a maiores rendimentos de extração (VIEIRA et al., 2018).

Na literatura é possível encontrar trabalhos usando os DESs para muitos fins, dentre eles o uso como solventes para a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais. Grudniewska et al. (2018) utilizaram ChCl e glicerol na razão molar 1:2 para extrair proteínas da torta obtida na extração de óleo de colza e primula. Do extrato obtido com a extração, que representou entre 8 e 35% (m/m) do resíduo, os autores recuperaram de 40-50% de proteínas, utilizando precipitação com água atuando como um anti-solvente. Vieira et al. (2018) avaliaram o desempenho de DESs compostos por ChCl combinado com vários ácidos carboxílicos, para a extração de compostos ácidos fenólicos e flavonoides das folhas de nogueiras. Utilizaram o solvente preparado com 20% de água (v/v) e compararam os resultados com a extração realizada com etanol e água na proporção 1:1 (v/v) por 60 min a 50°C. Os autores obtiveram $24,9 \pm 0,1$ mg / g utilizando o solvente com etanol e água e dentre os ácidos usados os melhores resultados foram obtidos para o cloreto de colina com ácido fenilpropionico ($34,3 \pm 0,2$ mg / g) e com ácido butírico ($33,7 \pm 0,4$ mg / g).

3.3 Proteínas obtidas de resíduos vegetais

As proteínas são ingredientes importantes na indústria de alimentos, pois possuem não apenas funções nutricionais e fisiológicas, mas também características tecnológicas relacionadas às suas propriedades físico-químicas (POJIĆ et al., 2018). São classificadas de acordo com sua solubilidade em quatro categorias: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em álcool) e glutelinas (solúveis em ácidos diluídos ou alcalinos) (SANTOS et al., 2014). As proteínas podem ser adicionadas aos produtos alimentícios com a finalidade de alterar a aparência, a textura e a estabilidade, atuando, por exemplo, na modificação da solubilidade, viscosidade, capacidade de formação de espuma e emulsificação e capacidade de absorção de gordura (POJIĆ et al., 2018).

Existe uma busca crescente por dietas mais proteicas e essa busca por proteínas vegetais é influenciada não apenas pelo crescente vegetarianismo e veganismo, mas também pela mudança dos hábitos alimentares e das dificuldades que envolvem a cadeia produtiva da carne. Essa demanda, inicialmente suprida por produtos de origem animal, pode ser suprida pela utilização de proteínas de fontes novas que incluem insetos, fungos e algas, bem como as obtidas através da extração de resíduos do processamento de alimentos (POJIĆ et al., 2018).

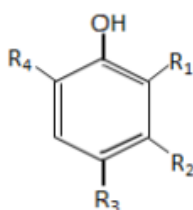
A substituição de proteínas animais por proteínas vegetais de subprodutos alimentares tem sido impulsionada pela garantia de sustentabilidade na produção de alimentos. Estudos têm mostrado que os subprodutos do processamento de cereais são matérias-primas adequadas

para a recuperação de proteínas (SANTOS et al., 2014). Apprich et al. (2014) afirmam que o farelo de trigo representa uma possível fonte para extração visto que contém de 13 a 18% de proteína. Em outro estudo de caracterização de resíduos agroindustriais Evangelista (2017) quantificou aproximadamente 7% de conteúdo proteico no farelo da casca do milho.

3.4 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são definidos quimicamente como moléculas orgânicas que apresentam pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, cuja forma básica é apresentada na Figura 3 (DOS SANTOS, 2013). Incluem os alcalóides, flavonóides, terpenóides e glicosídeos. Os fenólicos de fontes vegetais são metabólitos secundários derivados das vias das pentoses fosfato, chiquimato e fenilpropanóide (AYALA-ZAVALA et al., 2011). Existem grandes variações entre os teores totais desses compostos em frutos e vegetais, estando localizados preferencialmente nas cascas e sementes, apesar também de serem encontrados como componentes da parede celular de várias monocotiledôneas. Podem ser encontrados na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (AYALA-ZAVALA et al., 2011; BALASUNDRAM et al., 2006).

Figura 3 - Estrutura típica dos compostos fenólicos.

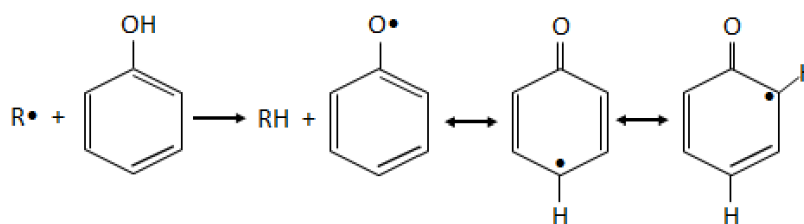


Fonte: Dos Santos, (2013).

Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes vegetais, acompanhados dos carotenoides e das vitaminas C e E (BALASUNDRAM et al., 2006). Além disso, têm sido associados a efeitos benéficos à saúde, os quais podem ser citados os efeitos antialérgicos, anti-aterogênicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitrombóticos, cardioprotetores e vasodilatadores (SILVA et al., 2010).

Segundo Dos Santos (2013) a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está estritamente relacionada com a ressonância do anel aromático. O grupo hidroxila doa um átomo hidrogênio ao radical livre e, então, o radical antioxidante formado é estabilizado pela ressonância do anel aromático (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismo de ressonância que mantém a estabilidade do anel.



Fonte: Dos Santos, (2013).

Por muitos anos a extração com solventes polares foi a técnica mais utilizada para obtenção de extratos com compostos fenólicos e atividade antioxidante, sendo a acetona, metanol, etanol e água os solventes mais utilizados (DOS SANTOS, 2013).

Na literatura alguns trabalhos descrevem a extração de compostos fenólicos de subprodutos de processamentos de alimentos. Castro et al. (2018) realizaram extração com solventes utilizando quatro diferentes misturas de água, etanol e metanol, aplicando ultrassom, para extrair compostos antioxidantes do resíduo de extração do óleo das sementes de café verde. Os autores obtiveram extração de 20,4% (p/p) para solução aquosa de etanol 70% (v/v). Valadez-Carmona et al. (2018) realizaram a extração de fenólicos presentes na casca do cacau, com fluido supercrítico (CO_2), utilizando etanol como co-solvente. Os autores verificaram que os experimentos mais eficientes com maior teor fenólico (13,6 e 12,4 mg EAG/g) foram os obtidos com maior % de etanol como co-solvente e nas maiores pressões (300 bar) e temperaturas (50 e 60 ° C) estudadas. Ozturk et al. (2018) investigaram a extração sólido-líquido, com solventes adicionados de cloreto de colina, glicerol ou etilenoglicol, para extrair compostos fenólicos da casca de laranja, obtendo 3,61 mg de compostos fenólicos EAG/g de casca de laranja. Wang et al. (2008) estudaram a extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de farelo de trigo. Os autores conseguiram um conteúdo fenólico total de 3,12 mg EAG/g de farelo de trigo testado, utilizando a concentração de etanol de 64%, a 60°C por 25 min. Eles verificaram ainda que a concentração de etanol interferiu significativamente na extração, visto que quando aumentou de 20% para 60% (v/v), o conteúdo total de fenóis aumentou de 1,67 a 2,81 mg EAG/g de farelo de trigo. E ainda, quando a concentração de etanol atingiu 80% (v/v), o conteúdo total de fenóis nos extratos de farelo diminuiu rapidamente, para 1,48 mg EAG/g de farelo de trigo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo da amostra

Este estudo foi conduzido utilizando resíduo de extração do óleo de milho fornecido pela empresa Cargill Agrícola S.A. Uberlândia. A amostra foi submetida a dois diferentes pré-tratamentos: secagem por liofilização (Marca LIOTOP, modelo L101) por 24 horas (ROML) e em estufa à vácuo a 60°C até peso constante (ROME).

A fim de realizar a caracterização granulométrica a amostra seca foi submetida ao processo de peneiramento, a partir do qual foi possível constatar a grande heterogeneidade do tamanho das partículas, variando de 16 a 170 mesh. Foram selecionadas as partículas de tamanho intermediário retidas nas peneiras de 28 a 42 mesh, para promover uma maior área de contato na extração e evitar aglomerações do resíduo.

4.2 Preparo dos solventes

Foram preparados quatro diferentes solventes eutéticos utilizando o glicerol como o composto orgânico doador de hidrogênio, sendo que dois foram preparados usando como sal o cloreto de colina e dois o acetato de sódio.

O solvente eutético de acetato de sódio foi preparado segundo a metodologia descrita por Karageorgou et al. (2017) com modificações. O glicerol foi misturado com acetato de sódio (Ac:Gli) na proporção molar de 1:1 e 1:2, com 20% de água (m/v) e aquecido de 60 a 70°C por 60 minutos sob agitação, até formação de um líquido homogêneo. O solvente eutético de cloreto de colina e glicerol (ChCl:Gli), na proporção molar de 1:1 e 1:2, foi preparado segundo Fraige et al. (2019), onde ambos os componentes foram aquecidos a 80°C com 20% de água (m/v), até que um líquido homogêneo fosse formado.

Além desses, foram utilizados solventes convencionais preparados com etanol e água 50 e 65% (v/v) com 1 M de NaOH segundo Cookman & Glatz (2009).

4.3 Extrações

As extrações foram realizadas em tubos de ensaio com tampa a uma temperatura controlada de 50°C por duas horas. O resíduo do óleo de milho foi submetido à extração com 6 diferentes solventes na proporção 1:15 (m/v).

Em um estudo preliminar o resíduo foi colocado em contato apenas com a água sob agitação por um minuto também na proporção 1:15 (m/v), para posterior quantificação dos fenólicos solúveis livres.

Todos os extratos obtidos foram centrifugados a 7000 rpm por 15 min a 25°C. O sobrenadante foi recolhido para a realização de análises posteriores.

4.4 Proteínas totais

As proteínas totais da amostra foram determinadas pelo método de Kjeldahl (DE OLIVEIRA et al., 2007).

As proteínas presentes nos extratos foram medidas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolína), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (Sigma-Aldrich) utilizando leitura de absorbância a 562nm e a curva de calibração contendo soro albumina bovina na concentração 0 a 2000 µg/mL como padrão (ROJAS-MOLINA et al., 2008).

4.5 Fenólicos totais

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a determinação dos fenólicos totais de cada amostra (CHIREMBA et al., 2012). Primeiramente 20 µL do extrato, da solução de ácido gálico ou água foram adicionados ao tudo de ensaio, seguido de 1,58 mL de água destilada e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu, que foram agitados e deixados em repouso em ambiente protegido da luz e à temperatura ambiente por 5 minutos. Então, 300 µL de solução saturada de Na₂CO₃ foi adicionada. A solução foi incubada à temperatura ambiente e em ambiente escuro por mais 2 horas, e então a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 765 nm em espectrofotômetro. O procedimento foi realizado em triplicata. O total em fenólicos de cada amostra foi mensurado como equivalente ao ácido gálico (EAG) baseado na curva de calibração de ácido gálico de 0 a 100 mg/L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

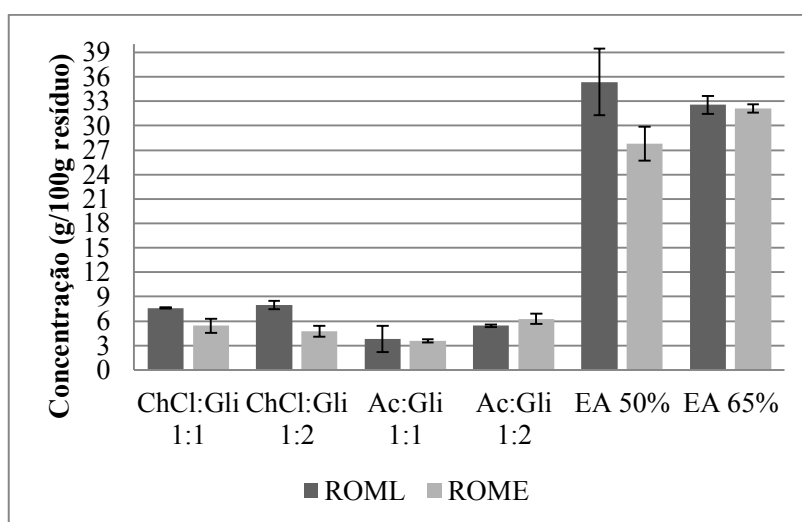
5.1 Extração de proteínas

Inicialmente foi realizada a quantificação do conteúdo proteico presente na amostra, utilizando o método do nitrogênio equivalente. O valor obtido, de $8,05 \pm 0,05\%$, foi abaixo do reportado por Froes et al. (2012) que mensuraram um conteúdo proteico do gérmen com pericarpo de milho desengordurado de 12%.

Devido a grande heterogeneidade de tamanho de partícula da amostra, após a etapa de peneiramento parte do pericarpo, que estava em fragmentos maiores, acabou não sendo utilizada. Como este componente também tinha conteúdo proteico, ao descartá-lo, o conteúdo total da amostra foi reduzido. Ainda assim, a amostra apresentou um conteúdo proteico significativo. Esta proteína pode ser extraída e utilizada como ingrediente ou suplemento pela indústria de alimentos, e o resíduo resultante pode ser destinado para outro fim, como produção de etanol de segunda geração.

O teor de proteína nos extratos após um tempo de extração de 2 h do resíduo da extração de óleo de milho liofilizado (ROML) e seco em estufa a vácuo (ROME) é mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Concentração de proteína no extrato após 2 horas de extração com diferentes solventes.



Fonte: A autora.

Os resultados obtidos da quantificação dos extratos variaram de $3,55 \pm 0,21$ a $35,35 \pm 4,10$ (g/100 ROM). Em relação ao ChCl:Gli, não houve diferença entre as duas frações molares avaliadas. Os valores diferiram apenas em relação ao tratamento da amostra, em que

a liofilização apresentou o maior resultado dentre os solventes eutéticos ($8,01 \pm 0,51$ g/100g ROM). Fraige et al. (2019), ao avaliar diferentes composições de solvente formados por cloreto de colina, glicerol e água, observaram que a proporção 1:1 com 20% de água foi a melhor para a extração de metabólitos identificados por HPLC das folhas de *Byrsonima intermedia*.

Para o Ac:Gli, a amostra liofilizada não sofreu influência da fração molar utilizada, já para a amostra seca em estufa à vácuo a razão molar 1:2 foi melhor para a extração ($6,27 \pm 0,64$ g/100g ROM). Não foi possível encontrar na literatura um estudo realizado com acetato de sódio para extração de proteínas. No entanto, o estudo realizado por Karageorgou et al. (2017) verificou que houve diferença significativa na extração de polifenóis das folhas de *Moringa olifera* para diferentes proporções molares de glicerol e acetato de sódio e quantidade de água adicionada. A melhor proporção foi identificada para o glicerol e acetato de sódio na proporção molar de 6:1 ($53,80 \pm 7,15$ mg EAG/g ROM). Os autores utilizaram proporções molares de glicerol maiores que o usado neste trabalho, e ainda verificaram que a melhor extração foi a com maior quantidade de glicerol. Em estudos futuros, aumentar a proporção de glicerol neste solvente seria uma boa estratégia para tentar melhorar a extração.

Em relação à extração com os solventes de etanol alcalino (EA), apenas a extração com solvente 50% com a amostra seca em estufa a vácuo foi diferente e apresentou o menor resultado ($27,83 \pm 2,09$ g/100g ROME). Para o EA 65% o tratamento da amostra não influenciou a extração. Cookman & Glatz (2009) ao extrair as proteínas do resíduo de alambiques mostraram que o tratamento da amostra (moída e não moída) influenciou nos resultados de extração, dependendo da porcentagem de etanol. Verificaram que a extração com etanol alcalino 45% foi mais eficiente que as soluções etanólicas de 60% e 95%.

Não foi possível comparar os resultados de extração dos DES com os solventes de EA, pois os resultados destes últimos se mostraram muito superiores à quantidade total de proteína presente no resíduo sólido quantificado inicialmente pelo método de Kjeldahl. Isto sugere que este solvente foi capaz de extrair outros compostos que interferiram na medida de proteína dos extratos, feita pelo método BCA. De acordo com Froes et al. (2012) o gérmen com pericarpo de milho desengordurado possui aproximadamente 3% de lipídios totais e 39% de carboidratos, dentre eles os solúveis e redutores. Cookman & Glatz (2009) mostraram que ao utilizar o etanol alcalino na extração de proteínas do resíduo sólido de alambiques, o mesmo foi capaz de extrair também massa não protéica. O etanol também é capaz de extrair óleo dos grãos de milho (RICHARD KWIATKOWSKI; CHERYAN, 2002) e de soja (TOMAZIN

JUNIOR, 2008). Neste estudo, como o solvente era uma mistura aquosa, provavelmente foi possível extrair também os carboidratos redutores e solúveis.

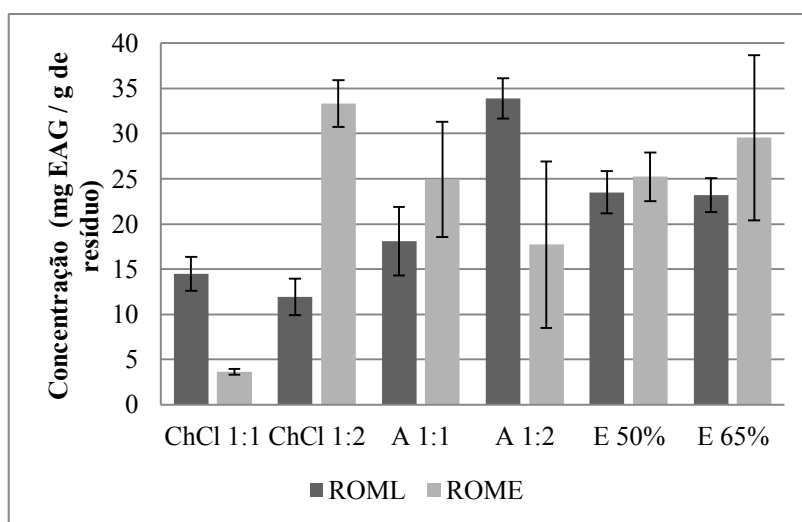
O método BCA se baseia na reação de cobre (II) com proteínas em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo que absorve fortemente na região de 560nm. Segundo Zaia et al. (1998) as substâncias que reagem com os íons cobre (reações de oxidação-redução, formação de complexos, precipitação) ou com o reativo de BCA, são interferentes desse método. Dentre os interferentes presentes na nossa amostra estão os açúcares que promovem a redução parcial do cobre (II) e os lipídios que reagem com o BCA, resultando em falsos positivos.

As proteínas quantificadas nos extratos obtidos com os solventes eutéticos foram próximas ao valor total proteico quantificado no resíduo sólido pelo método de Kjeldahl, mas como os métodos de quantificação de proteínas da amostra e dos extratos foram diferentes, não foi possível calcular da eficiência de extração. As extrações utilizando solvente a base de cloreto de colina e amostra liofilizada apresentou melhor desempenho que as extrações utilizando solvente a base de acetato de sódio.

5.2 Extração de Fenólicos Totais

O teor de fenólicos totais obtido para os diferentes solventes após extração de 2 horas, representado em mg de EAG por grama de amostra, é mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Concentração de compostos fenólicos totais no extrato após 2 horas de extração com diferentes solventes.



Fonte: A autora.

Da extração com água por 1 min foram obtidos os resultados de $2,34 \pm 0,10$ e $2,16 \pm 0,13$ (mg EAG/g ROM) para a amostra liofilizada e seca em estufa à vácuo, respectivamente. Os resultados foram bem menores que todos os obtidos após a extração com os solventes, cujo conteúdo de fenólicos nos extratos variou de $3,64 \pm 0,29$ a $33,90 \pm 2,25$ (mg EAG/g ROM), mostrando que os métodos de extração se mostraram eficientes na extração dos fenólicos da amostra. Na literatura foram encontrados resultados menores do que os valores máximos quantificados neste trabalho em relação aos compostos fenólicos totais presentes no milho utilizando solventes convencionais. Zilic et al. (2012) obtiveram 5,78 mg EAG/g de grãos de milho inteiros utilizando extração com um solvente preparado com acetona, metanol e água. Lopez-Martinez et al. (2009) quantificaram 5,51 (mg EAG/g ROM) de fenólicos totais em grãos de milho amarelo usando solvente aquoso de etanol na concentração de 80%.

Os maiores valores de extração foram obtidos para os solventes eutéticos com a proporção molar de 1:2, sendo que não foi observada diferença entre o cloreto de colina ($33,34 \pm 2,61$ mg EAG/g ROML) e acetato de sódio ($33,90 \pm 2,25$ mg EAG/g ROME). Um resultado semelhante foi encontrado por Mouratoglou et al. (2016) que compararam solventes eutéticos a base de glicerol e cloreto de colina ou acetato de sódio na proporção molar (3:1), sendo etanol aquoso 60% usado como solvente controle. Os autores verificaram que na extração de compostos polifenólicos dos resíduos agro-alimentares utilizados, os solventes formados por glicerol e cloreto de colina ou acetato de sódio exibiram resultados semelhantes e alta eficiência de extração, comparáveis ou até mesmo superiores à do etanol aquoso.

As extrações com etanol alcalino apresentaram resultados semelhantes. É possível que a variação de concentração de etanol tenha sido pequena para causar diferença na extração. Waszkowiak & Gliszczyńska-Świgło (2016) ao estudar a influência da concentração de etanol no solvente aquoso usado para extrair compostos fenólicos do extrato de linhaça, observaram que ao diminuir a concentração de etanol de 65 para 60% houve um ligeiro aumento de fenólicos extraídos: de 98,5 para 106 mg EAG/g. Além disso, constataram que o conteúdo de ácidos fenólicos não se alteraram significativamente com o aumento da concentração de etanol como solvente de extrato de 60 a 70%, já a concentração de 80% de etanol resultou em uma redução considerável no conteúdo destes compostos.

Os maiores resultados de extração de fenólicos foram obtidos para as extrações feitas com ChCl:Gli 1:2, amostra seca em estufa; Ac:Gli 1:2, amostra liofilizada; e etanol 65%, amostra seca em estufa. Levando em consideração os desvios, pode-se considerar que estas extrações tiveram o mesmo desempenho. Analisando custos de processo (energia e reagentes), dentre as condições avaliadas, a melhor seria a extração com etanol 65%, amostra seca em

estufa. O cloreto de colina ainda representa um custo elevado para a extração e o solvente de acetato de sódio, nas proporções molares utilizadas, dificultou a manipulação, devido à alta viscosidade. Foram obtidos bons resultados para os dois tratamentos de amostra, entretanto o processo de liofilização ainda tem um custo alto quando comparado à estufa à vácuo.

6 CONCLUSÃO

Todos os solventes avaliados apresentaram capacidade de extração das proteínas presentes no resíduo analisado. A extração com ChCl:Gli da amostra liofilizada teve o maior resultado dentre os solventes eutéticos, mas não sofreu influência em relação à fração molar dos componentes. Já nas extrações utilizando o Ac:Gli os valores foram maiores para maior fração molar de glicerol. O método BCA não foi adequado para quantificação dos extratos do solvente de etanol alcalino, impossibilitando a comparação com os solventes eutéticos. Em estudos posteriores podem ser analisadas frações molares maiores de glicerol para extração e utilizar outro método de quantificação de proteínas dos extratos, de forma a permitir o cálculo da eficiência da extração.

Em relação à extração de compostos fenólicos foi possível verificar que os solventes eutéticos com maiores frações molares de glicerol tiveram melhor desempenho, e ainda que estes apresentaram resultados semelhantes entre si e com o etanol alcalino 65%. Como foram obtidos bons resultados para os dois tipos de tratamento da amostra, em estudos posteriores deve ser utilizado a secagem em estufa à vácuo, visto que representa menor custo para o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTUALIX. **Óleo de Milho – Produção (Toneladas)**. 2016. Disponível em: <<https://pt.actualitix.com/pais/wld/oleo-de-milho-paises-produtores.php>>. Acesso em 10 de junho de 2019.
- APPRICH, S. et al. **Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products**. LWT - Food Science and Technology, v.56, n.2, p.222-231, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.003>
- AYALA-ZAVALA, J. F. et al. **Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives**. Food Research International, v.44, n.7, p.1866-1874, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses**. Food Chemistry, v.99, n.1, p.191-203, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- BOTTI, S. C. C. F. **Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica *in vitro***. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado), Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, São Paulo, 2016.
- BRUNELLI, S. R. **Farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de frangos de corte**. 2014. 55 f. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- CASTRO, M. V. L. D. et al. **Fração Gérmen com Pericarpo de Milho na Alimentação Humana: Qualidade Nutricional e Aplicação Tecnológica**. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.41, n.2, p.213-219, 2011. <https://doi.org/10.5216/pat.v41i2.9659>
- CASTRO, A. C. C. M. et al. **Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds**. Food Chemistry, v.246, p.48-57, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.153>
- CHIREMBA, C. et al. **Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness**. Food Chemistry, v.134, n.1, p.81-88, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.067>
- COOKMAN, D. J.; GLATZ, C. E. **Extraction of protein from distiller's grain**. Bioresource Technology, v.100, n.6, p.2012-2017, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.059>
- DANTAS, V. F. D. S. **Potencial energético dos resíduos da cultura do milho (*Zea mays L.*) e do epicarpo do pinhão manso (*Jatropha curcas L.*)**. 2013. 38 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- DE CORATO, U. et al. **Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.88, p.326-346, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.041>

DE OLIVEIRA, J. P. et al. **Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos.** Pesquisa Agropecuária Tropical, v.34, n.1, p.45-51, 2007.

DELGADO-AGUILAR, M. et al. **Extending the value chain of corn agriculture by evaluating technical feasibility and the quality of the interphase of chemo-thermomechanical fiber from corn stover reinforced polypropylene biocomposites.** Composites Part B: Engineering, v.137, p.16-22, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.11.006>

DIAS, M. C. G. C. **Caracterização do Solvente Eutético Profundo Aplicado em extração Líquido-Líquido.** 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

DOS SANTOS, W. J. **Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (Mangifera indica L.) utilizando CO2 supercrítico, água e etanol.** 2013. 112 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

EMBRAPA. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho.** Ministério da Agricultura, 2006. Disponível em:
 <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

EVANGELISTA, I. V. **Caracterização de resíduos agroindustriais para a produção de etanol de segunda geração.** 2017. 65 f. Monografia (TCC), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

FRAIGE, K. et al. **Using natural deep eutectic solvents for the extraction of metabolites in Byrsonima intermedia leaves.** Journal of Separation Science, v.42, n.2, p.591-597, 2019.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201800905>

FROES, L. D. O. et al. **Gérmen com pericarpo de milho desengordurado na formulação de biscoitos tipo cookie.** Ciência Rural, v.42, p.744-750, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000400028>

GRUDNIEWSKA, A. et al. **Enhanced Protein Extraction from Oilseed Cakes Using Glycerol-Choline Chloride Deep Eutectic Solvents: A Biorefinery Approach.** ACS Sustainable Chemistry & Engineering, v.6, n.11, p.15791-15800, 2018.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04359>

HUANG, J. et al. **Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products.** Journal of Chromatography A, v.1598, p.1-19, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.046>

J. ANDERSON, T.; LAMSAL, B. **REVIEW: Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review.** v.88, p.159-173, 2011. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-10-0091>

JIN, Q. et al. **Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept.** Trends in Food Science & Technology, v.74, p.119-131, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.014>

KARAGEORGOU, I. et al. **Enhanced extraction of antioxidant polyphenols from Moringa oleifera Lam. leaves using a biomolecule-based low-transition temperature mixture.** European Food Research and Technology, v.243, n.10, p.1839-1848, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2887-1>

LONGO JR., L. S.; CRAVEIRO, M. V. **Deep Eutectic Solvents as Unconventional Media for Multicomponent Reactions.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v.29, p.1999-2025, 2018. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180147>

LOPEZ-MARTINEZ, L. X. et al. **Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize.** LWT - Food Science and Technology, v.42, n.6, p.1187-1192, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>

LOSS, E. M. S. **Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do milho para o cultivo de cogumelos comestíveis.** 2009. 65 f. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

MARTINS, N.; FERREIRA, I. C. F. R. **Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications.** Trends in Food Science & Technology, v.62, p.33-48, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.014>

MOREIRA, I. et al. **Utilização do farelo de germe de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento e terminação: digestibilidade e desempenho.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, p.2238-2246, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000900012>

MOURATOGLU, E.; MALLIOU, V.; MAKRIS, D. P. **Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass.** Waste and Biomass Valorization, v.7, n.6, p.1377-1387, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9539-8>

OZTURK, B.; PARKINSON, C.; GONZALEZ-MIQUEL, M. **Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents.** Separation and Purification Technology, v.206, p.1-13, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.05.052>

POJIĆ, M.; MIŠAN, A.; TIWARI, B. **Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin.** Trends in Food Science & Technology, v.75, p.93-104, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>

REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F.; CASTELLUCCI, A. C. L. **Processamento e industrialização do milho para alimentação humana.** Visão Agrícola, v.13, p.138-140, 2015.

RICHARD KWIATKOWSKI, J.; CHERYAN, M. **Extraction of oil from ground corn using ethanol,** v.79. 2002. 825-830 p. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0565-8>

ROJAS-MOLINA, I. et al. **Analysis of Quality Protein Changes in Nixtamalized QPM Flours as a Function of the Steeping Time.** *Cereal Chemistry*, v.85, n.3, p.409-416, 2008. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-3-0409>

SALINAS-MORENO, Y. et al. Phenolic Compounds in Maize Grains and Its Nixtamalized Products. In: SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M; MARIA DEL ROSARIO

SANTOS, E. M. et al. **Thermal and rheological properties of masa from nixtamalized corn subjected to a sequential protein extraction.** *Journal of Cereal Science*, v.60, n.3, p.490-496, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.08.008>

SILVA, M. L. C. et al. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais.** *Ciências Agrárias*, v.31, n.3, p.669-682, 2010. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>

SILVÉRIO, H. A. **Extração e caracterização de nanocristais de celulose a partir de sabugo de milho, e sua aplicação como agente de reforço em nanocompósitos poliméricos utilizando poli (álcool vinílico) como matriz.** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. **Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications.** *Chemical Reviews*, v.114, n.21, p.11060-11082, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

SOUSA, L. C. F. **Caracterização e estudo da hidrólise do resíduo da fabricação de pamonha visando a produção de etanol.** 2018. 66 f. Tese (Mestrado)–Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

SOUZA, A. C. P. **Extração de compostos fenólicos de subprodutos do processamento de sementes de girassol.** 2013. 34 f. Monografia (TCC), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

TOMAZIN JUNIOR, C. **Extração de óleo de soja com etanol e transesterificação etílica na miscela.** 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado)–Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

VALADEZ-CARMONA, L. et al. **Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.131, p.99-105, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.011>

VIEIRA, V. et al. **Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L.** *Industrial Crops and Products*, v.115, p.261-271, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.029>

WANG, J. et al. **Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran.** *Food Chemistry*, v.106, n.2, p.804-810, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.062>

WASZKOWIAK, K.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. **Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts.** European Food Research and Technology, v.242, n.5, p.777-786, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2585-9>

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química Nova, v.21, p.787-793, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>

ZILIC, S. et al. **Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels.** J Agric Food Chem, v.60, n.5, p.1224-31, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf204367z>