



BIOPLASTICS BRAZIL | CONGRESSO CIENTÍFICO INTERNACIONAL SOBRE BIOPLÁSTICOS | 26 E 27 DE ABRIL

📅 11/04/2023

Bioplastics Brazil 2023

Congresso científico internacional sobre bioplásticos

Local: Auditório da ABIMAQ – Av. Jabaquara, 2925 – Vila Monte
Alegre, São Paulo – SP, 04045-902

CARACTERIZAÇÃO DA ZEÍNA BRUTA EXTRAÍDA DOS RESÍDUOS DE GRÃOS DE MILHO PARA SUBSTITUIR OS PLÁSTICOS DESCARTÁVEIS DE ORIGEM FÓSSIL ID.BIO2

*Sergio A. Yosioka, Bruno Garcia de Oliveira Breda¹, Gabriel S. Florintin², Antonio
Ambrosio Garcia³, Márcia C. Bracinforti⁴*

Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, sergiy@iqsc.usp.br

¹Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, brunobbreda3@usp.br

²Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil,
gabrielflorin@usp.br, arcia

³ Departamento de Materias, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil,
antonio99@usp.br

⁵ Departamento de Materias, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil,
marciacb@sc.usp.br

Resumo

O uso da grande quantidade de plásticos descartáveis de origem fóssil está acarretando problemas de saúde a vegetação e animais terrestres e aquáticos, não só ao ser humano. Estes plásticos na forma de canudos de refrigerantes, sacolas plásticas, copos e garrafas de refrigerantes ou de água, geralmente acabam indo aos aterros sanitários ou correntes de rios, lagoas e oceanos, formando em alguns casos no oceano pequenas ilhas destes plásticos, já que pouca quantidade é reciclada ou reaproveitada. Infelizmente estes plásticos podem levar centenas de anos para biodegradar-se na Natureza, ou formar microplásticos (<5mm) que podem ser consumidos por todos os animais terrestres ou aquáticos. A solução definitiva seria substituir estes plásticos por bioplásticos biodegradáveis, tais como amido termoplásticos e/ou proteínas não hidrossolúveis, no caso das prolaminas existentes nos cereais, compondo cerca de 50% (m/m) das proteínas existentes nestes cereais em alguns casos. Devido a produção de grande volume de etanol ou de amido de cereais, as suas proteínas são utilizadas como ração animal, só que parte destas proteínas são não digeríveis pelo rúmen (PNDR) dos bois, por causa da composição destas proteínas que apresentam grande quantidade de aminoácidos apolares e da prolina e glutamina, não são facilmente degradadas por quaisquer proteases. Neste experimento, a zeína bruta do milho que foi solubilizada por processo em meio etanólico modificado, foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho de transformada de Fourier (FTIR), análises térmicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimétricas (TGA) e por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados obtidos mostraram que não existem grandes quantidades de zeína bruta nos coprodutos da usina de etanol de milho (grãos secos de destilaria, DDG, e grãos úmidos de destilaria, WDG, com ou sem óleo); enquanto que o CGM60 das fábricas de amido de milho (Ingredion Incorporated) tinham mais de 30% de zeína bruta. A zeína bruta extraída do CGM além de ter massa molares iguais ao da Aldrich, possui cerca de 10% de carotenóides ainda presente, contudo possuem comportamentos térmicos similares ao da zeína da Aldrich. Apesar da sua pequena quantidade nos DDG e WDG, a zeína bruta pode ser extraída dos resíduos sólidos das usinas de etanol retirados antes da fermentação na

forma úmida. Por ser solúvel em meio hidroetanólico e não em meio aquoso, ser fundível abaixo de 80°C, pelo seu baixo custo de extração (<R\$20,00/kg), de fonte renovável e sustentável e reaproveitamento do solvente (EtOH), possibilita o uso da zeína bruta em diversos formatos, tais como esferas, filmes, tubos, nanopartículas, adesivos, revestimentos e outras formas (blendas ou compósitos), tornando um bioplástico versátil, que por ser uma proteína (constituídas por aminoácidos), o que a torna compostável ou biodegradável dentro de uns 100 dias em condições adequadas de umidade e temperatura.

Palavras-chave: zeína bruta, caracterização, bioplásticos, sustentável.

1. INTRODUÇÃO

O consumo elevado de plásticos descartáveis de origem fóssil está provocando grandes mudanças ambientais, entre eles, grandes mortandades de animais marinhos, aves e peixes com ingestão de microplásticos e a sua presença nas placentas e nos pulmões de seres humanos [1], o que torna imprescindível a sua proibição de distribuição e comercialização desses materiais, principalmente alguns produtos comercializáveis [2], tais como, alimentos, o seu transporte e a sua preservação; contudo com a pandemia mundial da COVID-19, diversas leis municipais brasileiras de proibição de uso e distribuição de plásticos em bares e restaurantes estão suspensas até essa pandemia passar [3].

Assim, um tipo de bioplástico de origem animal ou vegetal é de grande importância para substituir os plásticos de origem de petróleo ou fósseis de uso único, o que reduziria drasticamente a poluição do ambiente com plásticos descartáveis. Contudo, o processo de extração tem que ser viável economicamente e que reutilize o solvente diversas vezes e de baixo custo e que o plástico ou polímero de origem biológica (bioplástico ou biopolímero) seja biodegradável, compostável e/ou comestível. Este tipo de biopolímero que poderá ser extraído é a zeína do milho (proteína presente nos endospermas dos grãos de milho, cerca de 6 a 8%, m/m, junto com amido).

A extração da zeína do milho pode ocorrer por combinações químicas, com adição ou não de tratamento enzimático, sendo que alguns fatores contribuem para eficiência do processo, como: tipo de solvente, temperatura, pH e tempo de extração [4,5]. Atualmente, a metodologia empregada para extração de zeína no Brasil é descrita por FORATO et al. [6]. De acordo com eles, a zeína obtida a partir do farelo de glúten do milho (CGM) é tratada inicialmente com hexano em extrator Soxhlet por 24hs para a

remoção de gorduras; seguida de agitação em solução de cloreto de sódio por 6h (para remoção das outras proteínas presentes nos grãos de milho). Por fim, a zeína é solubilizada com solvente etanol a 70% por 24h e precipitadas na evaporação, seguida por liofilização com rendimento baixo, máximo de 40% do total presente.

A evolução dos processos, devido as constantes pesquisas, contribuiu para a diminuição de custos e melhores controles de extração referentes a preparação do milho, diferenças do tipo de moagem e variações de temperaturas e pH. A zeína comercial é composta de alfa-zeína e tende a ser de alta qualidade e pureza, podendo ser obtida dos produtos industrializados dos grãos de milho ou por moagem úmida, com formação de glúten, mas os rendimentos ainda são considerados baixos em ambos métodos, inferiores a 25%, havendo a necessidade de contínua pesquisa para novos tipos de tratamentos e solventes [6,7,8,9]. Um método de extração empregado comercialmente é referente a CARTER e RECK desde 1970, usando como solvente 88% de isopropanol/água[10]. Um processo semelhante em meio etanólico, mas não igual foi desenvolvido por YOSHIOKA em 2021[11], que pode apresentar problemas de segurança individual na preparação e também corroer os aços inoxidáveis de péssima qualidade, devido a presença de ácido ou álcalis fortes.

Um processo de extração da zeína bruta dos grãos de milho foi e está sendo desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Departamento de Bioquímica e Biomateriais no Instituto de Química de São Carlos-USP da zeína bruta em meio não corrosivo hidroalcoólico com alto rendimento cerca de 90% da zeína bruta presente no farelo de glúten de milho com 60% de proteínas (CGM60), o que equivale a próximos de 50% das proteínas totais nestes farelos. Isto é um rendimento alto de extração, só que o processo da bancada do laboratório ir até a indústria tem um caminho longo a fazer, isto é, ter uma planta piloto de extração da zeína dos farelos de glúten de milho com recuperação e reuso do solvente, e também ter os equipamentos para produzir os bioplástico a partir da zeína bruta para produção de protótipos de bioplásticos descartáveis de zeína bruta [11].

Segundo Jaski et al. (2022), a zeína é um material promissor que deve ser mais explorado em pesquisas acadêmicas e industriais, já que a zeína oferece propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, como hidrofobicidade, baixa permeabilidade ao vapor de água, boa capacidade de formação de filme, não toxicidade, biocompatibilidade, atividade

antimicrobiana e a possibilidade de adaptar essas propriedades usando modificações químicas e combinações com diferentes materiais[12]. Além disso, a zeína apresenta vantagens notáveis como biopolímero, como sua biodegradabilidade, sua origem renovável e agrícola, a versatilidade das formas em que pode ser preparada e, o mais importante, não compete com a cadeia de suprimentos de alimentos. Contudo, tem-se um crescimento de produção mundial de zeína muito pífio de 5,8% entre 2023 a 2028, segundo análises da Expert Market Research (2022) [13]. Espera-se com esse novo processo e a planta piloto possa extrair maior quantidade de zeína bruta (~35%) do CGM60 e assim como a maior recuperação de etanol (>85%), sem danificar a zeína e provavelmente purificar a zeína para agregar valor menor que aquele praticado no mercado Nacional, já que a zeína Aldrich custa cerca de U\$300.00/kg no Brasil [12]. Um biomaterial ou bioplástico extraído de resíduos vegetais renováveis e sustentáveis com processo mais verde e a baixo custo (<U\$10.00/kg) poderá entrar no mercado facilmente, principalmente se tiver um preço final entre R\$12,00 a R\$15,00 por kg na forma bruta e a purificada o dobro desse preço no mínimo, desde que não produzam microplásticos, como os plásticos de origem fóssil que custam cerca de R\$11,00/kg e só biodegradam-se depois de 100anos ou mais, o que não é o caso da zeína por ser uma proteína.

2. OBJETIVOS

Neste experimento, a zeína bruta do milho, que foi solubilizada por processo em meio etanólico modificado da patente de Yoshioka [W], foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho de transformada de Fourier (FTIR), análises térmicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimétricas (TGA) e por eletroforese em gel de poliacrilamida para mostrar que a zeína bruta pode ser similar a a zeína Aldrich , necessitando apenas desenvolver um processo de purificação para algumas aplicações. Estes resultados foram comparados com aqueles da zeína Aldrich para futuros cálculos de valor de venda da zeína bruta no mercado brasileiro.

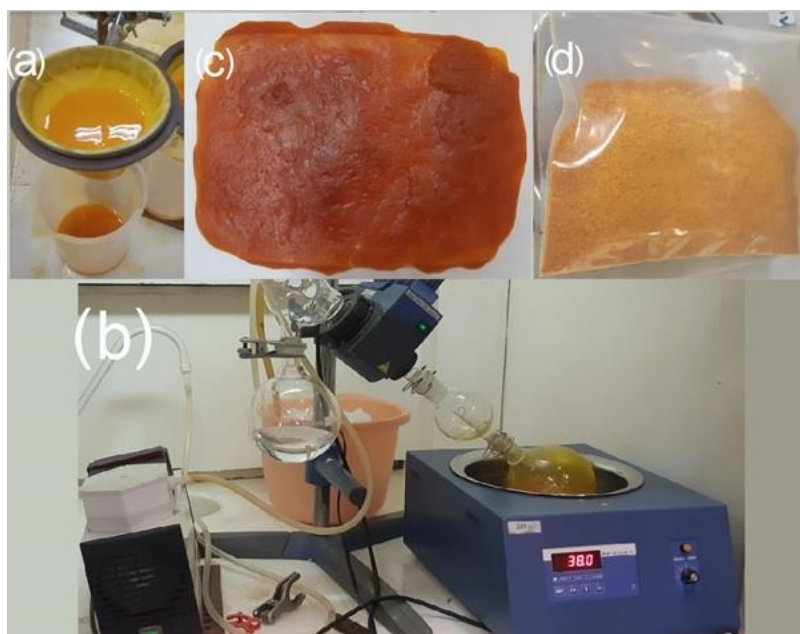
3. MÉTODOS E MATERIAIS

Os materiais utilizados foram: Farelo de gluten de milho (CGM) fornecida pela empresa Ingredion Incorporated; Etanol (95% v/v) da Êxodo Científica; tubo de diálise de celulose fornecida pela Viskase Embalagens (Atibaia – SP).

a) Extração da zeína

O processo de extração da zeína foi realizado no laboratório de Bioquímica e Bbiomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da USP. 500g de farelo de glúten de milho contendo 60% de proteínas totais (CGM-60) foram misturados com mixer em 2L de solução da hidroetanólica (80%) por 10 minutos e deixava decantar por 12h. Ao final desse tempo, notava-se uma separação de fases: na região inferior, encontrava-se como um pó decantado, enquanto na região superior a solução tinha aspecto amarelado, composta predominantemente por zeína (com carotenóides) e álcool. A seguir, foi realizado processo de filtração em duplicata, para separar o sobrenadante do material decantado e remover eventuais partículas de amido presentes no sobrenadante. Então, o sobrenadante recolhido foi levado a um rotaevaporador à vácuo. Esse processo foi realizado até obter-se uma solução concentrada, lavada com água quente e ocorria a precipitação da zeína bruta, como mostrado na figura abaixo. Esta zeína foi retirada e espalhada sobre bandeja de polietileno e seca na estufa por 12hs. Uma vez seca, a zeína seca foi triturada num liquidificador ou mixer e guardada em frasco ambar até o seu uso.

Figura 1: Etapas do processo de extração da zeína. (a) Filtração do sobrenadante, (b) destilação em rotaevaporador, (c) placa de zeína após secagem em estufa e (d) zeína em pó após moagem.



A) Caracterização da zeína bruta obtida

1) Eletroforese em gel de Policarilamida/SDS

As amostras de zeína bruta e da Aldrich foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos em solução de b-mercaptoetanol; Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8); glicerol; SDS 10% (p/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v). A eletroforese foi conduzida em gel (SDS-PAGE) com gradiente de 15%, imerso em solução-tampão Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% (pH 8,3). Para a identificação das proteínas presentes nas amostras, foram utilizados padrões BIO RAD. As bandas foram reveladas com o corante Coomassie-G-250 e tiradas imagens digitais.

2) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização por FTIR foi realizada em espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum 100, no intervalo de comprimentos de onda de 4000 a 550 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de + 4 cm^{-1} em pastilhas de KBr produzida com mistura de sal seco e puro de KBr e adição de 1% da zeína bruta ou da Aldrich, misturada num almofariz com pistilo e colocada na prensa de inox para obtenção de pastilhas transparentes com 1,0cm de diâmetro.

3) Análises térmica

Para essa análise foram usadas amostras de zeína bruta e da Aldrich em torno de 10,0mg de cada para cada análise, conforme foram obtidas.

a) Análise termogravimétrica (TGA)

As medidas foram realizadas de 25 até 800 °C, em atmosfera de ar sintético, com amostras de aproximadamente 10 mg e taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em um equipamento de TGA, modelo Q-50 da TA Instruments, verificado com oxalato de cálcio.

A caracterização termogravimétrica foi feita em equipamento Perkin Elmer modelo Pyris 1. As amostras de zeína bruta seca de 10,0mg foram aquecidas da temperatura ambiente (25°C) até 800°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio à 20 mL/min.

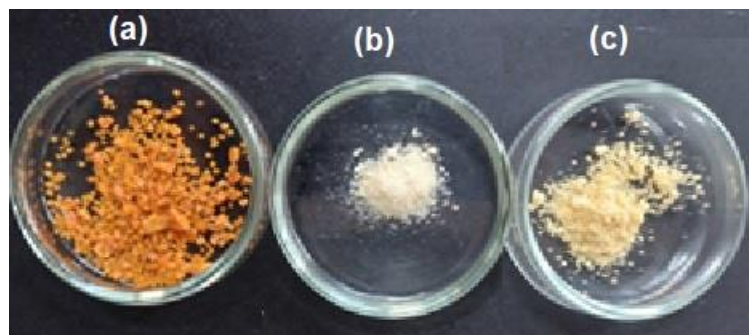
b) Calorimetria Exploratório Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial por fluxo de calor foi realizada para identificar possíveis mudanças de fases da zeína bruta e da Aldrich. As curvas DSC foram obtidas em um equipamento TA Instruments, modelo DSC 2010 calibrado com padrão de índio, com as amostras em panelinhas e tampas de alumínio. A razão de aquecimento será de 10 °C min⁻¹, na faixa de aquecimento de 25 a 250 °C, em atmosfera de nitrogênio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A zeína extraída por um novo tratamento hidroetanólico teve um ótimo rendimento apesar de ser uma zeína bruta, chegando aos 35%(m/m) de rendimento no farelo de glúten de milho (CGM60) fornecido pela Ingredion Incorporated, assim como a da Indemil. As zeínas brutas utilizadas nestas caracterizações foram comparadas com aquela obtida comercialmente da Aldrich brasileira por ser a mais utilizada para pesquisa e a mais purificada. Dados preliminares do nosso processo de purificação em bancada de laboratório, como mostrado na Figura 2 abaixo, indicam que a zeína bruta purificada apresentou mais branca ou menos amarelada que a zeína Aldrich, mas isso iremos comprovar pela análise cromatográfica líquida de alta resolução ou performance futuramente, contudo tem-se que verificar se existe um equipamento que possa realizar essa purificação em grande escala, cerca de 0,5tonelada para até 5toneladas por dia, senão não teremos um produto purificada muito mais caro que o prouto da Aldrich, o que invibiliaria comercialmente a sua purificação.

Figura 2: Fotografias digitais das amostras das zeína bruta (a), zeína purificada (b) e da Aldrich (c) utilizadas nesse trabalho.



As amostras pulverizadas e secas apresentaram características de proteínas com as técnicas a seguir:

1) Eletroforese em Gel de poliacrilamida/SDS

Esse processo de caracterização mostra a presença de proteínas e as quantidade, contudo se estiver em concentrações muito baixas não é possível verificar as massas molares de proteínas em quantidades menores que 10% da cadeia proteica de maior proporção, o que ocorrer no caso da caseína, que possuem 2 cadeia majoritárias a α -zeína e β -zeína, além do que determinadas condições de extração pode afetar a

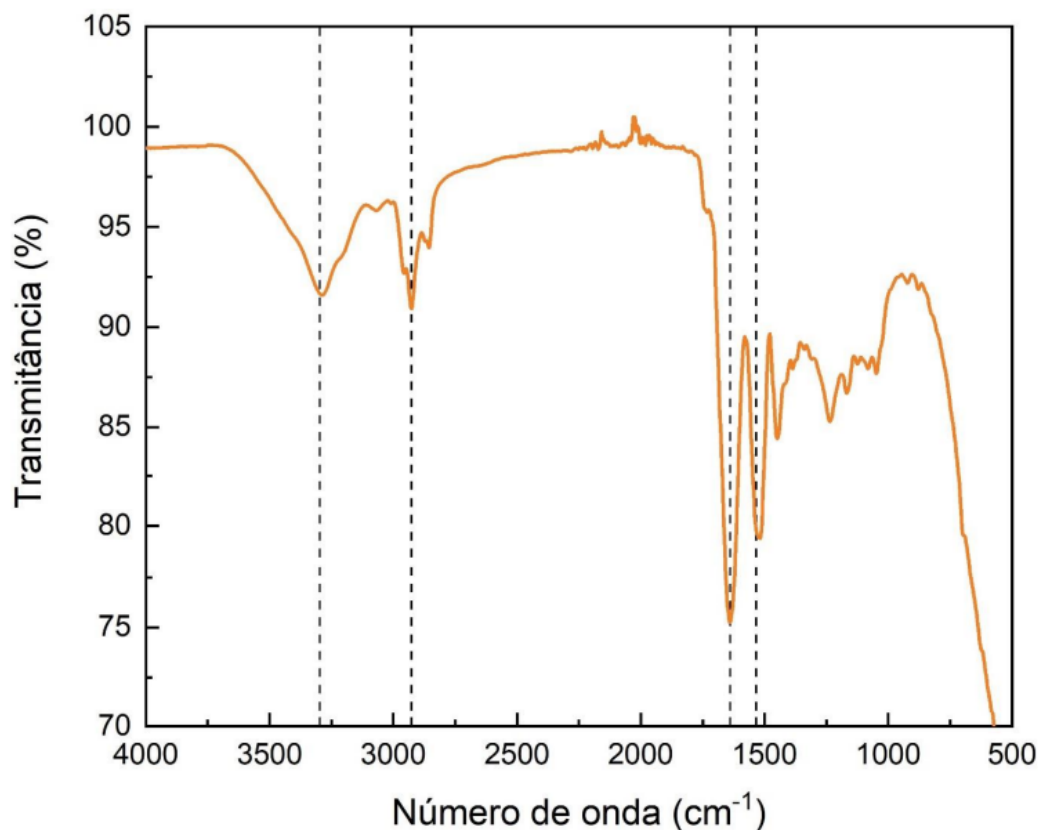
solubilização de uma delas também ou ainda quebrar as ligações dissulfetos e formar cadeias proteicas de massas molares similares aqueles das principais cadeias..

O gel de eletroforese mostrou a presença de 2 cadeias principais α e β -zeínas de massas molares de cerca de 22.000 Da e 19.000Da equivalentes a α e β zeínas, mas muito tênues, por isso que não foi mostrado no momento.

2) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A figura 2 mostra o espectro de infravermelho obtido para a zeína na forma de pastilha de KBr.

Figura 2: Espectro FTIR da zeína bruta e Aldrich (comercial).



Fonte: Próprio autor.

Para a zeína, os picos relevantes indicados por linhas tracejadas na Figura 2 foram:

- 3300 cm^{-1} : Referente ao estiramento do grupo N – H;
- 2930 cm^{-1} : Referente ao grupo carboxila;
- 1639 cm^{-1} : Referente ao grupo amida I, predominantemente do estiramento C = O e, em menor parte, do estiramento C – N e da deformação angular N – H no plano [14];

- 1540 cm^{-1} : Referente ao grupo amida II, da deformação angular no plano N – H e estiramento C – N. [14].

Espectros de proteínas costumam ser mais complexos e difíceis de analisar pela sua grande diversidade de elementos e grupos funcionais. Porém, neste caso, o espectro da zeína mostrou picos evidentes a grupos característicos de proteínas, como os do grupo amida I e amida II, e está de acordo com a literatura (ALI et al., 2014). Como os espectros no IFTIR da zeína Aldrich ou comercial foram similares, ficou difícil diferenciar os dois espectros, por isso só foi colocado um espectro apenas.

3) Análises térmicas

a) Análises Termogravimétricas (TGA)

Observa-se pela Figura 3 que a degradação térmica se inicia a baixas temperaturas e ocorreu majoritariamente em uma única etapa, com temperatura de taxa de degradação máxima de 331°C . Este valor está condizente ao encontrado em literatura [15]. Pode ser observada também uma perda de massa de aproximadamente 10% entre 25°C e 200°C , e é coerente com a literatura. Isso se deve à evaporação de água naturalmente presente em derivados de milho e possivelmente de etanol remanescente do processo de extração. [16].

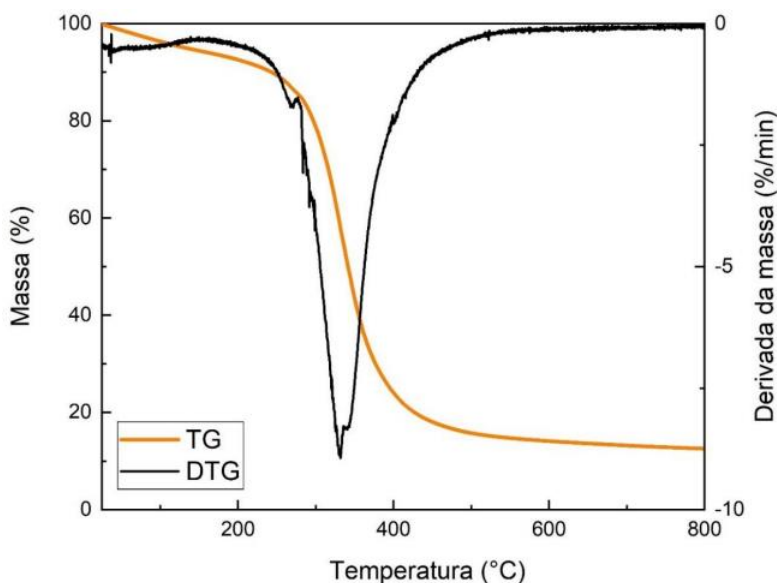
Para avaliar indiretamente a pureza e da zeína extraída da CGM, foi realizada uma comparação das curvas de TG da zeína extraída da CGM com a da zeína comercial. A similaridade entre as curvas TG pode indicar uma semelhança entre os materiais. Sabendo que a zeína comercial tem alto grau de pureza, espera-se que uma curva semelhante da zeína própria também possua boa pureza.

As curvas TG da zeína extraída da CGM e da zeína comercial foram mostradas na figura 12, nas cores azul e laranja, respectivamente.

Para facilitar a análise, o gráfico da Figura 2 foi dividido em três regiões, separadas por linhas tracejadas verticais. Na primeira região, entre 25°C e 250°C , nota-se que a zeína extraída no laboratório teve uma perda de massa um pouco mais acentuada que a zeína comercial. Isto sugere que a zeína extraída possui mais água e álcool remanescentes do processo de extração. Já na segunda região, entre 250°C e 360°C , a perda de massa é bem similar entre as zeínas. Por fim, na terceira região, nota-se uma perda de massa maior para a zeína comercial, a qual está correlacionada com a justificativa apresentada da região 1. Como a zeína Aldrich possui menor porcentagem de água, ela possui uma concentração de zeína propriamente dita maior, e sua degradação continua de forma mais acentuada. Quanto ao aspecto físico, a zeína extraída no laboratório possui cor laranja vibrante, enquanto a zeína

comercial tem coloração amarelo claro e opaca. Essa diferença provavelmente se dá pela maior presença de carotenoides na zeína extraída, como a luteína, a zeaxantina e ϵ -criptoxantina, pois estudos, como o de Rios et al., 2014 [17], comprovam que grãos de milho mais alaranjados possuem maior proporção desses componentes.

Figura 12: Curvas TG da zeína extraída da CGM e da zeína comercial.



Fonte: Próprio autor

b) Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

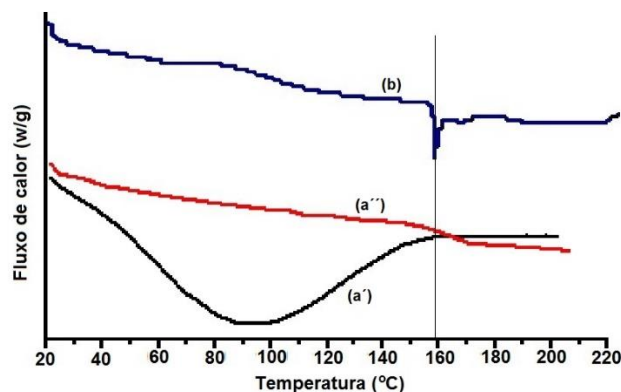
Os resultados de DSC (Figura 4) mostram:

- Existência de muita água presente,
- Segunda corrida na mesma amostra mostrou a transição vítrea (T_g), apesar de pequena comparada a pura próxima a 160°C sem sua decomposição;
- Possível extrusão dessa proteína a temperatura menor que 160°C, o que é interessante para obtenção de filmes finos, copos e canudinhos ou revestimentos de papel-cartão descartáveis.

5. CONCLUSÕES

Como podem ver pelos resultados acima que a zeína bruta extraída não diferenciou muito com a zeína Aldrich, apesar da presença dos carotenóides, o que dá uma colocação alaranjado, mas segundo as últimas reuniões com P&D de indústrias plásticas, é uma forma de diferenciar dos plásticos que são brancos ou transparentes, o que tornaria essa zeína bruta com preço competitivos com plásticos de origem fóssil, cerca de R\$15,00/kg contra os R\$11,00/kg dos plásticos de origem fóssil.

Figura 12: Curvas de DSC da zeína bruta primeiras (a') e segunda corrida (a'') e da zeína Aldrich (b).



Com advento de nossos processos de purificação poderá torná-la da cor que os consumidores-clientes finais gostariam de ter, mas uao de corantes naturais, o que já estamos desenvolvendo com as extrações de antocianinas naturais presentes em cascas, palhas, frutos e flores de outros vegetais. Assim tendo uma matéria-prima rica em zeína bruta a baixo custo, cerca de R\$1,00/kg dos resíduos úmidos de grãos de milho (RuGEM), pode facilmente bater o percentual pífio de crescimento do aumento de produção da zeína de 5,8% entre 2023 a 2028, segundo análises da Expert Market Research em 2022 [13], para mais de 100% com esse novo processo de extração com recuperação de uns 90% do etanol utilizado. Essa recuperação e rendimento de 35% de extração se mativer numa planta piloto, teremos algumas usinas de etanol de milho, em vez de vender WDG a R500,00/ton, mas RuGEM a R\$1,000,00/ton, e desenvolver novos bioplásticos a partir da zeína bruta ou purificada (<https://www.zeinproducts.com/>) com 100% compostos de biopolímeros naturais, como no caso dos canudos, caixas e copos de papel cartão colados e revestidos com zeína, ou melhor ainda, susbtituir o isopor de poliestireno expandido por amido expandido revestido com zeína totalmente biodegradável.

6. AGRADECIMENTOS

- Ingredion Incorporated pelo CGM60 fornecido;
- Aos Srs.funcionários do CAQ-IQSC pelas análises realizadas e ao Sr. W. Oshiro pelo suporte técnico;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO-LOURENÇO, L.F. et al. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. J. of Hazardous Materials, v.416, 15 August 2021, 126124. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>. Acesso em 29/06/2021.
2. NADKARNI, I.T.; CHATAIN, B. Parlamento Europeu aprova restrições aos produtos de plástico descartáveis. Comunicado de Imprensa do Parlamento Europeu, Referência

- nº 20190321IPR32111. Disponível em:
https://www.europarl.europa.eu/pdfs/news/expert/2019/3/press_release/20190321IPR32111/20190321IPR32111_pt.pdf. Acesso em 06/07/2021.
3. MELLO, D. Liminar suspende lei que proíbe copos e talheres de plástico em SP. Publicado no site da Agência Brasil em 03/04/2020. Disponível em <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2020-04/liminar-suspende-lei-queproibe-copos-e-talheres-de-plastico-em-sp>. Acesso em 29/06/2020.
 4. SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, v.13, p. 171-192, 2001.
 5. CAPOBIANGO, M. et al. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, v.26, n.4, p.884-890, 2006.
 6. FORATO, L.A. et al. Propriedades mecânicas e molhabilidade de filmes de zeínas extraídas de glúten de milho. *Polímeros*, v.23, n.1, p.42-48, 2013.
 7. LAWTON, J.W. Zein: a history of processing and use. Review. *Cereal Chemistry*, v.79, n.1, p.1-18, 2002. Disponível em:
<http://www.prairiegold.com/zein_background.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2014.
 8. ANDERSON, T.J.; LAMSAL, B.P. Development of new method for extraction of aZein from corn gluten meal using different solvents. *Cereal chemistry*, v.88, n.4, p.356-362, 2011. Disponível em: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM-08-10-0117>>. Acesso em: 20 mar. 2014. doi: 10.1094/CCHEM-08-10-0117.
 9. GERALDI, C.A.Q. et al. Analise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. *ENGEVISTA*, v. 14, n.2, p.185-195, 2012. Disponível em: <<http://www.uff.br/engevista/seer/index.php/engevista/article/viewArticle/408>>. Acesso em: 10 maio 2013.
 10. CARTER, R.; RECK, D.R. Low temperature solvent extraction process for producing high purity zein. Nutrilite Products Inc. (California, EUA). US 3535305, 12 Fev. 1968, 20 Out. 1970.
 11. YOSHIOKA, S.A. Processo de extração etanólica de prolaminas de resíduos dos grãos de cereais em meio etanólico/aquoso ácido ou básico. BR 10 2020 009163 8, protocolado no INPI em 08/05/2020.
 12. JASKI, A.C.; et al. Zein - a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses. *Industrial Crops & Products*, v.186, 115250, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115250>.

13. ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações Técnicas Espectroscópicas Vibracionais ao Estudo Conformacional de Proteínas. *Química Nova*, v. 14, n. 1, p. 31–43, 1991.
14. ALI, S. et al. Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research*, v. 22, n. 9, p. 971–977, 2014.
15. HEUDARI, M. et al. Plant-based nanoparticles prepared from protein containing tribenuronmethyl: fabrication, characterization, and application. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 8, n. 1, 2021.
16. OLIVEIRO, M.; DI MAIO, E.; IANNACE, S. Effect of molecular structure on film blowing ability of thermoplastic zein. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 115, n. 1, p. 277–287, 2010.
17. RIOS, S. DE A. et al. Color of Corn Grains and Carotenoid Profile of Importance for Human Health. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 6, p. 857–862, 2014.