

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

FRANCINE MARA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO CRIOULO DE
AGRICULTORES DE BASE FAMILIAR PARA OBTENÇÃO DE ETANOL**

PONTA GROSSA

2016

FRANCINE MARA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MILHO CRIOULO DE
AGRICULTORES DE BASE FAMILIAR PARA OBTENÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Bioenergia na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Área de concentração: Biocombustíveis.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra R. Masetto Antunes

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto

PONTA GROSSA

2016

S237 Santos, Francine Mara
Caracterização de cultivares de milho crioulo de agricultores de base familiar para obtenção de etanol / Francine Mara Santos. Ponta Grossa, 2016. 69 f.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia - Área de Concentração: Biocombustíveis), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Masetto Antunes.
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto.

1. Amido de milho. 2. Fermentação alcoólica. 3. Etanol. I. Antunes, Sandra Regina Masetto. II. Neto, Pedro Henrique Weirich. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biocombustíveis. IV.T.

CDD: 662.8

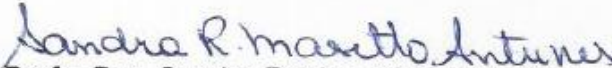
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIONERGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOCOMBUSTÍVEIS**

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCINE MARA SANTOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela seguinte banca examinadora

Orientadora:


Prof. Dra. Sandra Regina Masetto Antunes
UEPG/PR


Prof. Dr. Jose Raulindo Gardingo
UEPG/PR


Prof. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri
UTFPR/PR

Ponta Grossa, 23 de março de 2016.

Dedico à minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela coragem e força suficiente para alcançar todos os objetivos que busco e enfrentar todas as adversidades que surgem no decorrer da vida.

Aos professores, Sandra R. M. Antunes, Pedro Henrique Weirich Neto e todos os demais que estiveram me apoiando durante esse período, pela confiança em mim depositada e por estarem sempre disponíveis para auxiliar em todas as dúvidas, não só científicas, mas também dando conselhos que, certamente, levarei comigo por toda a vida.

Agradeço aos meus pais, Jamil e Sônia, meus anjos da guarda, que nunca hesitaram em me apoiar em todos os momentos e escolhas da minha vida, que me ensinaram que quando acreditamos num sonho a luta é sempre válida, e que desistir não deve fazer parte dos meus pensamentos; obrigada por serem meu exemplo de luta e coragem em minha vida. Aos meus queridos irmãos, Rafael e Luana, sempre presentes me apoiando e incentivando em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo, companheiro e amigo, Tiago, que em todos esses anos que estamos juntos sempre me apoiou, incondicionalmente, em seguir meus sonhos e me apoia em cada momento, seja feliz ou obstáculos que encontramos. Acredito que ainda cresceremos muito juntos, ainda mais, agora, que o nosso amado João Vitor encherá nossos corações de alegrias.

Às minhas amigas de anos, Priscila, Gabriela, Gabriele, Bianca, Rafaela pela amizade e companhia de vocês, mesmo longe, muitas vezes, sempre estão presentes no meu coração, aos amigos do Lama e aos outros vários amigos que tive a oportunidade de conhecer durante este tempo, pela companhia de cada dia e pela disponibilidade que sempre tiveram para me ajudar quando precisei.

Aos professores, Ivo Demiate e Alessandro Nogueira, pelo apoio e pela estrutura disponibilizada dos laboratórios do Departamento de Alimentos, ao laboratório multiusuário (C-LABMU) e a todas as empresas que forneceram materiais para serem utilizados neste estudo.

À Capes pelo apoio financeiro, à Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Mestrado de Bioenergia e a todos que, de maneira geral, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e realização deste sonho, muito obrigada!

SANTOS, Francine Mara. **Caracterização de cultivares de milho crioulo de agricultores de base familiar para obtenção de etanol, PR, Brasil**. Orientadora: Sandra Regina Masetto Antunes. Ponta Grossa, 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar o potencial de oito cultivares de milho crioulo oriundas de propriedades rurais de base familiar para obtenção de etanol. Esses cultivares foram provenientes dos municípios de Palmeira e Teixeira Soares-PR, região Centro-Sul do Paraná. Na caracterização agrônômica, analisou-se o sistema produtivo e a produtividade. Após a colheita as sementes foram caracterizadas físico-quimicamente. Com as sementes trituradas, foram realizados os processos de hidrólise pelas enzimas α amilase e amiloglucosidase e no processo de fermentação utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram realizadas análises térmicas pelo equipamento SHIMADZU, modelo TGA-50, programa TA-60WS, velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de ar de 150 mL min^{-1} , no intervalo de temperatura de 15°C a 650°C . Para avaliação superficial morfológica dos grânulos utilizou-se o equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura com efeito de campo (MEV-FEG), marca TESCAN, modelo MIRA 3, e para a composição elementar utilizou-se detector EDS (espectrômetro de raios-x de energia dispersiva) da marca Oxford instruments, modelo X-ACT. A produtividade do cultivar Amarelão (6307 kg ha^{-1}), com nível de investimento econômico e tecnológico pode ser considerada expressiva. Já o cultivar Palha Roxa, apresentou produtividade baixa (2611 kg ha^{-1}), associada devido a semeadura fora de período recomendado e estresse hídrico na floração. Os quantitativos relativos de amido dos cultivares denominados Brancos (Palmeira e Teixeira Soares) merecem mais estudos, com vistas a melhoramentos genéticos, pois apresentaram valores elevados ($751,4$ e $754,8 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente). Na análise térmica, as temperaturas de estabilidade (S) variam nos intervalos de 180°C a 206°C aproximadamente, sendo que o milho Rajado apresentou o maior valor. O valor relativo elevado de glicose alcançado pelo cultivar Caiano ($891,5 \text{ g kg}^{-1}$), mostrou diferencial de amido ou boa adaptação da enzima a este tipo de cultivar (amido) seguido pelo Palha Roxa, cuja transformação alcançou $845,4 \text{ g}$ de etanol kg^{-1} de glicose. Com relação à obtenção de etanol, ou conversão milho-etanol, destacam-se os cultivares Brancos, Caiano e Palha Roxa, cujos valores são superiores aos 400 L Mg^{-1} , valor considerado como referencial para cultura nesse tipo de processo.

Palavras-chave: Amido de milho. Fermentação alcoólica. *Zea mays*.

SANTOS, Francine Mara. *Characterization of creole corn cultivars of family-based farmers to ethanol obtaining*, PR, Brazil. 2016. 71 f. Dissertation (Masters in Bioenergy), State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

ABSTRACT

This study had as objective to verify the potential of creole corn cultivars from family-based rural properties in the ethanol obtaining. The creole corn cultivars were from the cities of Palmeira and Teixeira Soares-PR, in the South Central of Paraná. In agronomic characterization were analyzed the system of production and productivity. After harvesting, the seeds were characterized physical-chemically. With the crushed seeds, were realized the process of hydrolysis by the enzymes α amylase and amyloglucosidase and used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation process. As further studies, thermal analyzes were performed by Shimadzu equipment, TGA-50 model and TA-60WS program. The analyzes were performed with a heating speed of $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and air flow of 150 ml min^{-1} at temperature range of 15°C to 650°C . For the granules morphological superficial evaluation, was used the Electron Microscopy Scanning equipment with field effect (SEM-FEG), TESCAN brand, MIRA 3 model, and the elemental composition was used EDS detector (X-ray energy dispersive spectrometer) Oxford Instruments brand, X-ACT model. The productivity of Amarelão cultivar (6307 kg ha^{-1}), with the level of economic and technological investment can be considered significant. But Purple Straw cultivar, showed very low productivity (2611 kg ha^{-1}), which can be associated by sowing out of recommended period and water stress at flowering. The quantitative related to starch for the White cultivars (Palmeira and Teixeira Soares) deserve further studies with a view to genetic improvements, because they showed high values ($751,4$ and $754,8\text{ g kg}^{-1}$, respectively). In the thermal analysis, the temperature stability (S) varies in the range of 180°C to 206°C approximately, as the Rajado corn had the highest value (206°C). The high relative amount of glucose achieved by the Caiano cultivar ($891,5\text{ g kg}^{-1}$, showed differential of starch or enzyme good adaptation to this type of farming (starch). The same comment can be traced to the Purple Straw, when the fermentation process, whose transformation reached $845,4\text{ g kg}^{-1}$ of ethanol kg^{-1} of glucose. When it gives obtaining ethanol, or gives corn-ethanol conversion, highlight the White, Caiano and Straw Purple cultivars, whose values are higher than 400 L Mg^{-1} , a value considered as a reference to the culture for this kind of process.

Keywords: Corn starch. Alcoholic fermentation. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Rotas tecnológicas para a produção de etanol.....	15
Figura 2–	Panorama mundial da produção de grãos de milho em 2014.....	17
Figura 3–	Anatomia do grão de milho e suas partes.....	21
Figura 4–	Representação estrutural da amilose.....	23
Figura 5–	Representação estrutural da amilopectina.....	23
Figura 6–	Linhas de plantio e amostragem das plantações de milho na safra 2014/2015.....	34
Figura 7–	Curvas termogravimétricas por TG/DTG nas amostras dos cultivares de milho crioulo.....	48
Figura 8–	Micrografias obtidas pelo MEV-FEG dos grânulos de amido presente nas estruturas das amostras sem sofrer processo de hidrólise.....	51
Figura 9–	Micrografias dos grânulos após o processo de hidrólise nos cultivares de milho crioulo.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Panorama mundial da produção de etanol (milhões de litros ano ⁻¹).....	15
Tabela 2–	Composições físico-químicas dos grãos de milho híbridos e cultivares crioulos.....	20
Tabela 3–	Teor de amilose(%) de algumas variedades botânicas de amido em relação ao teor total de amido.....	24
Tabela 4–	Composição química de uma molécula de amido de milho.....	25
Tabela 5–	Identificação da cidade e estado de origem das populações crioulas de milho.....	33
Tabela 6–	Manejo utilizado durante condução agronômica dos cultivares.....	43
Tabela 7–	Características agronômicas da planta e grãos dos cultivares crioulos.....	44
Tabela 8–	Valores determinados de lipídeos, fibra bruta, proteína bruta e cinzas da matéria-prima dos cultivares de milho crioulo.....	45
Tabela 9–	Caracterização físico-química dos cultivares quanto aos teores de amido, açúcar redutor total e amilose total dos cultivares de milho crioulo.....	46
Tabela 10–	Resultados termogravimétricos por TG/DTG dos cultivares de milho crioulo.....	49
Tabela 11–	Composição elementar dos elementos químicos presentes nos cultivares avaliados.....	52
Tabela 12–	Resultados da avaliação do processo de hidrólise através da conversão do amido em glicose obtidos pela avaliação do processo de hidrólise.....	53
Tabela 13–	Avaliação do mosto hidrolisado das amostras para o processo fermentativo.....	56
Tabela 14–	Parâmetros avaliados do mosto antes e após a fermentação alcoólica utilizando diferentes cultivares de milho crioulo.....	58
Tabela 15–	Resultados quantitativos em massa a partir dos processos de obtenção de etanol em cultivares de milho crioulo.....	59
Tabela 16–	Resultados quantitativos por hectare (ha ⁻¹) a partir dos processos de obtenção de etanol em cultivares de milho crioulo.....	59

LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Lama/UEPG	Laboratório de Mecanização Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	BIOCOMBUSTÍVEIS.....	14
3.2	ETANOL ENQUANTO BIOCOMBUSTÍVEL.....	14
3.3	MATÉRIA-PRIMA: MILHO E O PANORAMA ATUAL DE MERCADO....	16
3.4	SEMENTES HÍBRIDAS E TRANSGÊNICAS.....	18
3.5	CULTIVARES DE MILHO CRIOULO.....	19
3.6	ANATOMIA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GRÃO.....	20
3.7	AMIDO DE MILHO.....	22
3.8	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	26
3.9	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
3.10	ETANOL A PARTIR DE FONTES AMILÁCEAS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	MATÉRIA-PRIMA.....	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE CAMPO.....	33
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO CRIOULO.....	34
4.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	35
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS HIDROLISADOS.....	36
4.5.1	Determinação de Açúcares Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	37
4.5.2	Determinação do pH.....	37
4.5.3	Determinação de Sólidos Solúveis (° BRIX).....	37
4.6	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	37
4.6.1	Ensaio Para o Processo Fermentativo.....	38
4.6.2	Determinações Analíticas dos Ensaio Fermentativos.....	38
4.6.2.1	Determinação de Biomassa Seca.....	38
4.6.2.2	Análise Cromatográfica de Etanol Por CLAE.....	38
4.7	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO.....	39

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE CAMPO.....	42
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO CRIOULO.....	44
5.2.1	Avaliação Térmica dos Cultivares de Milho Crioulo.....	47
5.2.2	Avaliação Microscópica dos Grânulos dos Cultivares de Milho Crioulo Por (MEV-FEG) Com Detecção Elementar Por EDS.....	50
5.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS MILHOS.....	53
5.3.1	Aspectos Morfológicos dos Cultivares Após a Hidrólise.....	54
5.4	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Em busca de sistemas sustentáveis, que atendem às necessidades básicas da sociedade e ambientalmente corretos, socialmente justos, economicamente viáveis e respeitem à cultura local, as políticas públicas têm estimulado a produção de energia alternativa renovável.

Uma das alternativas aos combustíveis fósseis é a produção de etanol a partir de materiais como a cana-de-açúcar, beterraba e milho. No Brasil, a produção consolidada do etanol é a partir de cana-de-açúcar, enquanto que nos Estados Unidos, a produção de etanol é a partir do milho.

O etanol é um produto da fermentação alcoólica de compostos orgânicos a partir da transformação do amido em glucose, sendo o micro-organismo principal a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo.

Ao longo dos anos, a cultura do milho utiliza vários métodos para melhoramento da semente para aumentar a produtividade e reduzir custos. Esse processo precisa de grandes quantidades de insumos externos para adaptação local, tornando-se, na maioria das vezes, inviáveis na agricultura familiar. Portanto, as unidades de base familiar de produção devem se basear em sistemas que promovam a diversificação de culturas, potencializadas em sistemas alternativos ao monocultivo. A alternativa é o resgate de espécies de cultivares, sem modificação genética, denominados milhos crioulos. Esses sistemas exigem menos insumos, são materiais importantes para o melhoramento genético da espécie, pois apresentam elevado potencial de adaptação local e condições ambientais específicas, além de sua importância na conservação da agrobiodiversidade (MOTHE; MACHADO, 2005).

No fracionamento do grão de milho, o endosperma é a maior fração do grão, composto basicamente por amido e resulta em um dos subprodutos mais utilizados em aplicações indústria industriais, com maior valor agregado. Essa fração pode ser utilizada como alternativa na produção do etanol.

Por esses motivos e pela importância da utilização de culturas não são geneticamente modificadas, o objetivo deste estudo é a caracterização de cultivares de milho crioulo obtidas, regionalmente, no Centro-sul do estado do Paraná, por produtores de base familiar, na obtenção de etanol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar o cultivar de milho crioulo, utilizadas regionalmente no Centro-sul do estado do Paraná por produtores de base familiar, com maior potencial para produção de etanol em função da produtividade e geração do produto por fermentação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os cultivares de milho crioulo em relação às características agronômicas e físico-químicas;
- Estimar o potencial para a produção de etanol dos cultivares de milho crioulo a partir da hidrólise enzimática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Muitas fontes de energias alternativas estão sendo estudadas para alcançar as metas de energias renováveis e uma das estratégias brasileira foi buscar experiências na área de biocombustíveis, pois há necessidade de diminuição na emissão de gases poluentes, principalmente pelas diversas mudanças climáticas relacionadas ao efeito estufa, provocadas pelo consumo desenfreado de combustíveis altamente poluentes. (CHAVES; GOMES, 2014).

Os biocombustíveis são os combustíveis que podem ser derivados de matérias-primas como a biomassa de cana de açúcar, oleaginosas, fontes sacaríneas, amiláceas, biomassa florestal, entre outras. Os mais conhecidos e utilizados são o etanol (álcool) e o biodiesel, aproveitados puros ou adicionados ao combustível convencional. (CHAVES; GOMES, 2014).

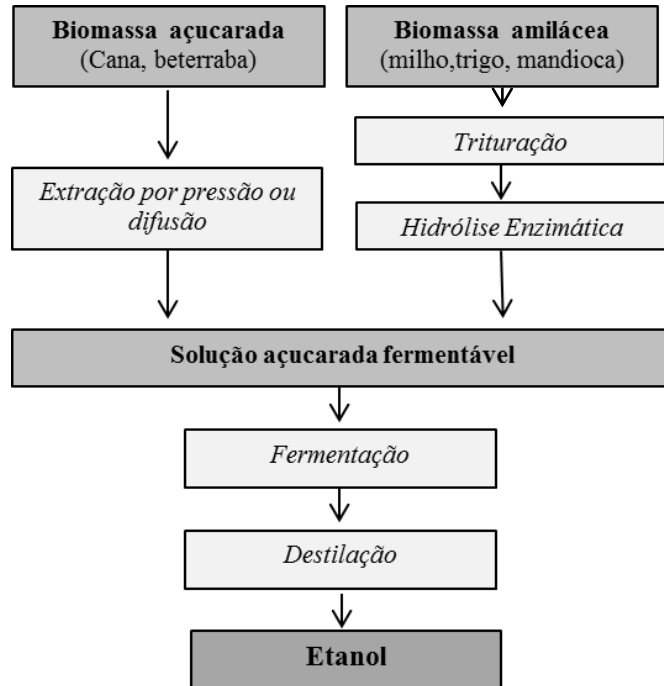
3.2 ETANOL ENQUANTO BIOCOMBUSTÍVEL

Atualmente, o etanol é um dos combustíveis renováveis mais importantes, sobretudo na redução do impacto ambiental gerado pelo uso de combustíveis fósseis. É o biocombustível líquido mais empregado e utilizado, seja como combustível principal (álcool hidratado) ou misturado à gasolina (álcool anidro). É derivado de biomassa renovável, possibilitando uma combustão mais limpa. Várias culturas são utilizadas como matéria prima nesta produção, incluindo a cana de açúcar e a beterraba açucareira, diretamente fermentáveis, ou matérias primas amiláceas, nas quais o amido deve ser convertido em açúcares como o milho, trigo e mandioca, entre outras fontes energéticas. (YANGCHENG *et al.*, 2013). Essas duas rotas tecnológicas estão esquematizadas na Figura 1.

No Brasil, as primeiras experiências com o álcool combustível se deram no período de 1920 com ampliação considerável na década de 1930, cuja fabricação era em Campos, no estado do Rio de Janeiro, com produção de 38 milhões de litros. Mas, somente em meados de 1975 foi criado um programa governamental, o Proálcool, para implantação de instalações e ampliação das destilarias vinculadas a usinas de açúcar. São Paulo era o estado com maior produção de etanol de cana de açúcar no País, mas com o incentivo desse programa Paraná, Mato Grosso e Goiás começaram a expandir sua produção canavieira. No ano de 2003, com a introdução da tecnologia *flexfuel* houve uma revitalização do uso do álcool combustível e com a expansão do

setor e da produção, o Brasil tornou-se um grande produtor de álcool derivado da cana de açúcar a preços internacionalmente competitivos. (FERES, 2010).

Figura 1 – Rotas tecnológicas para produção do etanol



Fonte: Camili (2010).

O rápido aumento da produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas tradicionais durante as últimas décadas trouxe mudanças dramáticas para os alimentos e sistemas agrícolas, sendo o amido a matéria-prima mais utilizada para a produção de etanol na América do Norte e Europa. O maior produtor mundial de etanol, Estados Unidos, sendo o Brasil, o segundo maior produtor (Tabela 1), com produção baseada no milho e na cana de açúcar, respectivamente. (SEMENČENKO *et al.*, 2013; SANCHEZ; CARDONA, 2008).

Tabela 1 – Panorama mundial da produção de etanol (milhões de litros ano⁻¹)

País	Milhões de litros ano ⁻¹
Estados Unidos	13.300
Brasil	6.267
Europa	1.371
China	696
Índia	545
Canadá	523
Outros países	727

Fonte: Renewable Fuels Association - RFA (2013).

No Brasil, poucas usinas investem em etanol de milho, pois o valor do etanol do grão ainda é superior ao da cana de açúcar. O cenário expansivo que se espera aporta e tem âncora

em decisão governamental de efetivamente incentivar o crescimento da oferta com o financiamento para a instalação de novas usinas e ampliação de unidades em operação. Esperam-se incentivos para a adaptação das existentes com condições de operar no denominado sistema *flex* de produção de etanol. Esse sistema é de produção nas entre safras da cana de açúcar, dividindo a produção em etanol de milho e cana de açúcar. Em média, uma tonelada de milho resulta em 345/395 litros de etanol, 220/240 kg de farelo/nutriente animal e 18/20 litros de óleo. (SOBRINHO, 2012).

O Brasil reúne vantagens competitivas para liderar a agricultura de energia, pois tem maior potencial de crescimento na produção de energia renovável, possui maior disponibilidade de terras agriculturáveis, posição geográfica privilegiada, clima favorável e grande competitividade internacional no setor sucroalcooleiro. (CINELLI, 2012).

Além dos Estados Unidos, um dos maiores produtores de etanol de milho no mundo, a Argentina apresenta projetos de etanol à base de milho que começaram a funcionar em larga escala em 2012, com tecnologia de moagem a seco. (PIERAGOSTINI; AGUIRRE; MUSSATI, 2014).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP), o teor alcoólico do etanol hidratado estipulado precisa ser entre 95,1 e 96 ° INPM, (unidade de medida equivalente à porcentagem de álcool na mistura).

Segundo a ANP (2011), o álcool anidro é aquele com quase 100% de etanol puro, comercializado misturado à gasolina, com intuito de melhorar o rendimento e diminuir os índices de poluição. O etanol precisa ser límpido e livre de impurezas. A densidade do álcool anidro deve ser de no máximo $791,5 \text{ Kg m}^{-3}$ (20 °C), não havendo especificação de um limite mínimo. Sobre a proporção de álcool, é necessário um teor alcoólico de no mínimo de 99,6%, tornando-se praticamente álcool puro, com massa mínima de 99,3%. (ANP, 2011).

3.3 MATÉRIA-PRIMA: MILHO E O PANORAMA ATUAL DE MERCADO

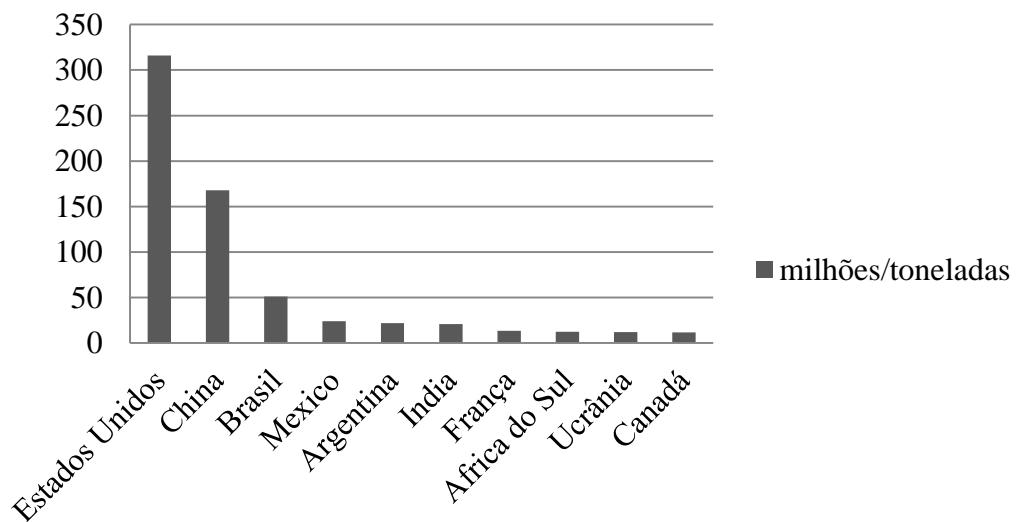
O milho (*Zea mays*), originário da América, provavelmente da região, onde hoje se situa o México, foi domesticado entre 7000 e 10000 anos atrás. O homem herdou mais de 300 raças de milho dos povos mais antigos, resultado da seleção, tanto artificial como natural, em diferentes adaptações. Ainda a diversidade de variedades intrarraciais e enorme quantidade de genes identificados, torna a espécie com maior diversidade genética. (PATERNIANI, 1993). É o cereal mais cultivado em todo o mundo podendo ser utilizado em vários setores industriais, além de constituir alimento básico para os seres humanos (milho grão) na maioria dos países

da América Latina, África e Ásia. (ROSAS-CASTOR *et al.*, 2014). Isso ocorre devido ao seu potencial produtivo, composição química e potencial nutritivo. (FANCELLI; DOURADO NETO; LUIZ, 2000).

Atualmente no mercado, o milho pode ser consumido em uma variedade de formas, na alimentação animal ou humana, processado ou in natura. (KLJAK; GRBESA, 2015). Nas áreas rurais, 50% da proteína utilizada é fornecido por este grão. (SERNA-SALDIVAR *et al.*, 2008), para ser empregado como matéria prima para produção de amido, óleo, farinha, glicose, produtos químicos, rações animais, embalagens e na formulação de concentrados alimentícios.

Em 2014, a produção mundial referente aos dez maiores produtores de milho foi equivalente à 847.526,00 mil/toneladas, sendo o Brasil, o terceiro maior produtor (Figura 2). (USDA, 2014).

Figura 2 – Panorama mundial da produção de grãos de milho em 2014



Fonte: USDA- United States Department of Agriculture (2014).

Em relação ao panorama nacional, o total das safras 2014/2015 registrado em 84.729,2 milhões de toneladas do grão, representou aumento de 5,8% em relação à safra anterior. A região Sul é o segundo maior produtor nacional de milho com produção equivalente na safra 2014/2015 a 25.225,0 mil toneladas. A região de maior produção nacional é a Centro-Oeste com 39.491,4 mil toneladas. As regiões Sudeste, Nordeste e Norte tiveram produção equivalente à 11.058 mil toneladas, 6.393 mil toneladas e 2.560 mil toneladas respectivamente. (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2015).

3.4 SEMENTES HÍBRIDAS E TRANSGÊNICAS

O denominado milho híbrido é oriundo de cruzamentos entre linhagens puras, utilizado nos plantios comerciais. Esse milho, como ocorre com todos os híbridos em geral tem viabilidade de uso recomendada somente na primeira geração e a cada safra a obtenção de novas sementes é aconselhada para obtenção de alta produtividade e vigor. (CARNEIRO *et al.*, 2000).

Já, os chamados eventos transgênicos são oriundos de inserções de DNA de um organismo em outro organismo. Em 1996, começa-se o cultivo de milho denominado Bt, modificado para resistir ao ataque de broca do milho, genótipo modificado geneticamente, contendo o gene da bactéria *Bacillus thuringiensis*, capaz de produzir uma proteína tóxica que acumula e forma cristais no interior da larva reduzindo ataques as plantas em até 90%. (CANHOTO, 2014).

No Brasil, a liberação da comercialização de sementes geneticamente modificadas (OGM) deu-se em 2008 e ao longo dos anos foram implantados no mercado, os milhos transgênicos. Em 2014, foram disponibilizados quatro híbridos triplos e quinze híbridos simples, com o gene BT que atribuíria resistência a lagartas desfolhadoras. (GALVÃO *et al.*, 2014).

Dentre as sementes transgênicas cultivadas mundialmente, novas variedades de plantas com genótipos aprimorados contra pragas comuns, tolerância a herbicidas e características melhoradas de resistência no plantio estão entre as mais comercializadas. (BRAKE; FAUST; STEIN, 2005).

Esse tipo de tecnologia é somente uma das mais diversas inovações comercializadas aos produtores agrícolas. Atualmente, a agricultura de grande escala é altamente dependente de insumos externos, sementes de cultivares transgênicos, utilização de adubos e defensivos químicos, são exemplos que apresentam alto custo e, muitas vezes, impactos ambientais não conhecidos. Por outro lado, estão caracterizados como um nicho que proporciona retorno econômico imediato para as grandes áreas produtivas. (GALVÃO *et al.*, 2014).

Na safra 2013/14, foram disponibilizadas 467 cultivares de milho (doze a menos do que na safra anterior), sendo 253 cultivares transgênicas e 214 cultivares convencionais. Na safra anterior, havia 38 cultivares transgênicas para, simultaneamente, controle de lagartas e resistência aos herbicidas glifosato e/ou glufosinato de amônio, aplicados em pós-emergência no milho. Este número passou para 65, em 2013/14. (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2014).

3.5 CULTIVARES DE MILHO CRIOULO

As populações crioulas de milho, também conhecidas como raças locais ou *landraces* são materiais importantes devido ao elevado potencial de adaptação a condições ambientais específicas. Não apresenta intervenções genéticas e tem potencial para contribuir com características necessárias para o melhoramento da planta e adaptações (resistência genética, pragas e *stress* abióticos), sendo cultivado em maiores proporções pela agricultura de base familiar. (ARAUJO; NASS, 2002).

A seleção dessas variedades pelos agricultores é prática comum em muitos países do mundo, pela alta rusticidade, valores culturais locais e adaptação às condições adversas de solo e de clima. (ARAUJO *et al.*, 2013).

Os cultivares crioulos são encontradas em condições ambientais de onde procedem, possibilitando sistemas de cultivos sustentáveis, menos exigentes em insumos e influenciando na preservação dos recursos naturais. (ARAUJO; NASS, 2002).

As sementes locais são componentes de valor importante para as populações tradicionais. (CATÃO *et al.*, 2010). Estudos revelam que nos últimos cem anos, os agricultores do mundo perderam de 90 a 95% de seus cultivares agrícolas em função da substituição dessas sementes por outras variedades genéticas de “alto rendimento”. (VOGT *et al.*, 2012).

As unidades rurais de agricultura familiar faziam uso das variedades locais ou tradicionais, gradativamente substituídas por materiais geneticamente melhorados, além de adotar novas técnicas de cultivo para subsidiar as maiores produtividades. Isso, portanto, fez com que o produtor passasse a ser dependente de grandes quantidades de insumos externos à propriedade. (MENEGUETTI; GIRARDI; REGINATTO, 2002).

Estudo com sementes híbridas e crioulas indicou que as variedades crioulas foram capazes de responder positivamente à aplicação de tecnologia no manejo da cultura tanto quanto os híbridos, além de superar sua média de produtividade em variedades híbridas. Práticas de manejo acessíveis, como adubação orgânica e o manejo alternativo de pragas são capazes de maximizar a produtividade de milho, proporcionando ao agricultor familiar maior rentabilidade. (ARAUJO *et al.*, 2013).

Em função da entrada das sementes híbridas e transgênicas no mercado, as preocupações quanto ao impacto causado aos cultivares crioulos aumentaram, pois irá se perder autonomia tecnológica, acumulada durante décadas por muitos agricultores familiares experientes na conservação e seleção dessas sementes. Em função disso, e devido à dependência causada pelas

sementes comerciais, é que muitos agricultores familiares estão resgatando as cultivares crioulas. (VOGT *et al.*, 2012).

Devido ao impacto causado em relação aos fatores ambientais, sociais e tecnológicos principalmente na agricultura familiar, o resgate destes cultivares locais ou crioulos se mostra como alternativa a esses agricultores, gerando autonomia e dispensando a dependência por insumos e sementes externos na propriedade. (CATÃO *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por Kokuszka (2005), a composição química de cultivares crioulos e híbridos, com os valores percentuais médios, em base seca, das regiões Irati e Rio Azul- PR estão expressos na Tabela 2. Nessas regiões, os cultivares crioulos foram cultivados em sistema orgânico de produção e os cultivares híbridos no sistema convencional de produção. Na região de Irati, o cultivar crioulo é popularmente conhecido como “vachake”, encontrado na própria comunidade; já o cultivar híbrido é o “traktor”. Na região de Rio Azul, o cultivar crioulo, utilizado é o talo roxo e o híbrido é o mesmo aplicado na região de Irati.

Tabela 2 – Composições físico-químicas de grãos de milho híbrido e cultivares crioulos

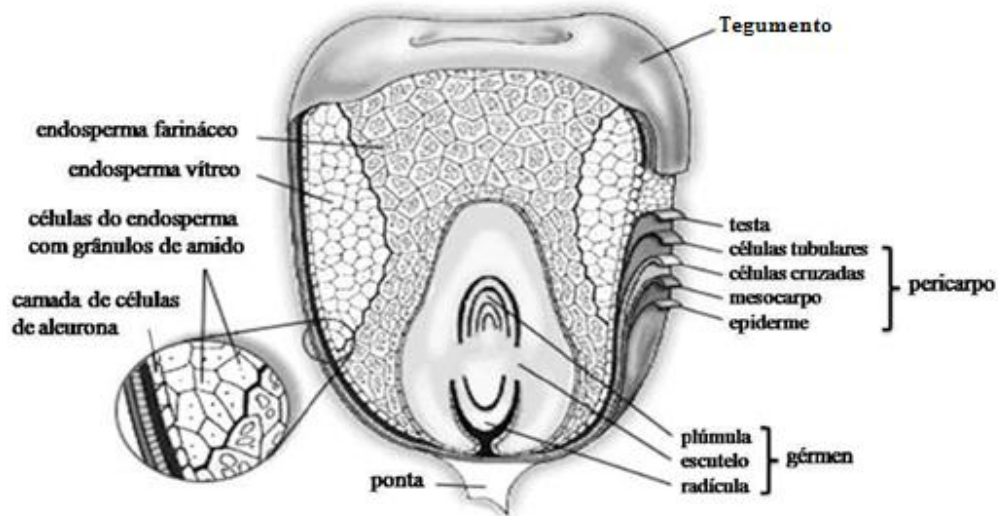
Componentes	Híbridos g/100 Base Seca	Cultivares crioulos g/100 Base Seca
Proteína	8,28	9,24
Lipídios totais	4,34	4,71
Carboidratos	74,46	71,67
Fibra alimentar	11,51	13,10
Nitrogênio (g kg⁻¹)	12,41	13,72

Fonte: Kokuszka (2005).

3.6 ANATOMIA DO GRÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

No milho dentado, o endosperma é duro nos lados e amiláceo no centro do grão, característica devido à interação dos genes sendo de caráter poligênico. Esse tipo de milho é o mais produzido no mundo, quanto mais dentado o grão, maior a quantidade de endosperma farináceo. (BATALHA, 2015). (Figura 3).

Figura 3 – Anatomia do grão de milho e suas partes



Fonte: Adaptação por Papalia e Londero (2015).

Mundialmente, há vários tipos de milhos com características distintas, como a coloração dos grãos, que pode variar de branco, amarelo, vermelho, roxo, marrom, verde e azul. O milho roxo, por exemplo, devido a sua coloração é uma variedade pigmentada, originalmente, cultivada na América Latina e importante fonte de antocianinas. No Brasil, os grãos mais conhecidos são de coloração branca e amarela. (YANG; ZHAI, 2010).

A composição do grão de milho contém aproximadamente 62% de amido, 10% de proteína e 4% de lipídios e uma densidade energética de aproximadamente 365 kcal 100g⁻¹. (ROSAS-CASTOR *et al.*, 2014). Outros autores apontam que a composição de amido é aproximadamente de 72%. (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010). Para Reguly (1996), a composição química do grão pode ser descrita como a umidade 12 a 13,5 %, o amido 58 a 65%, para açúcares redutores 2,5 a 5%, para a proteína de 9,5 a 12,5%, gordura de 3,9 a 6%, celulose de 2 a 4,7% e teor de cinzas de 1,3 a 2,7%, essa composição varia de acordo com a variedade, idade, estado de conservação, entre outros fatores. A massa do grão varia de 230 a 300mg, com diferentes composições. (PAES, 2006).

No uso do milho para o processo de fermentação, a desgerminação é importante, pois o gérmen é rico em óleo comestível e um subproduto lucrativo. A desgerminação pode ser realizada por moagem a seco em moinhos desgerminadores (canjiqueiras), pois permite a separação do gérmen do restante do grão ou por moagem úmida, necessariamente precedida de maceração ou remolho. A partir de uma tonelada de milho é possível extrair ou recuperar 100 kg de gérmen. (REGULY, 1996).

O gérmen apresenta composição relativa de 11% do grão, representado pelos lipídios (aproximadamente 83%), vitaminas, minerais, quantidade significativa de proteína e açúcares. (PAES, 2006). Segundo Reguly (1996), o gérmen é 11,5% do peso do grão de milho. O endosperma é responsável por aproximadamente 83% do grão seco, sendo 88 % de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo, apresentado em forma de grânulos e no qual estão presentes as proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas, chamadas zeínas. O pericarpo representa 6% do grão, sendo a camada de proteção das estruturas do grão contra umidade do ambiente, insetos e microrganismos, fração constituída de polissacarídeos, com 67% hemicelulose, 23% celulose e 0,1% lignina. E por fim tem-se a ponta ou ráquis, responsável pela conexão do grão, sendo a única área do grão não coberta pelo pericarpo. Sua composição é essencialmente de material lignocelulósico. (PAES, 2006; NUSS; TANUMIHARDJO, 2010).

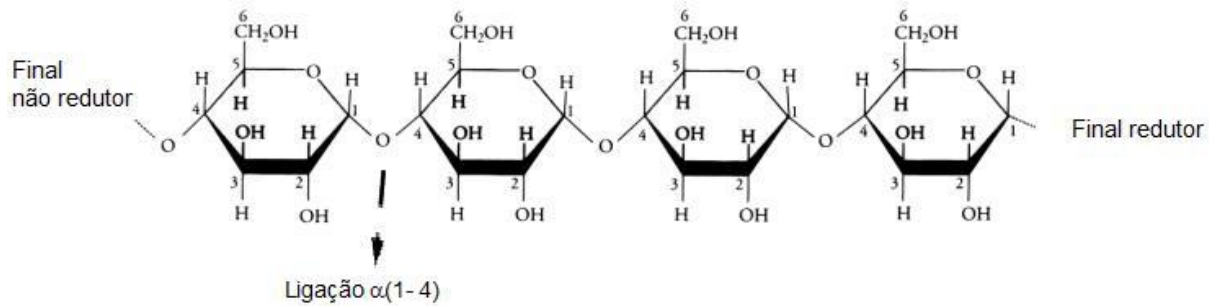
As características do endosperma também estão relacionadas com sua composição química. Com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz proteica, o endosperma pode ser vítreo ou farináceo, ligados à textura do grão. (PAES, 2006; REGULY, 1996).

3.7 AMIDO DE MILHO

O amido constitui-se pela fonte de reserva mais importante em muitas culturas economicamente importantes, tais como: trigo, arroz, milho, mandioca, batata entre outros. Essas culturas, amiláceas, estão entre os alimentos mais consumidos pela população mundial, in natura ou após sofrer transformações industriais. Devido às diferenças estruturais dos diversos tipos de amido não se pode generalizar nada sobre propriedades e comportamentos dos amidos de diferentes fontes botânicas. (MYAT; RYU, 2014; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

O amido é um polissacarídeo extraído das partes aéreas comestíveis dos vegetais, ramificado de unidades D-glicose, constituídas de duas frações distintas, amilose e amilopectina. Essas unidades são formadas por ligações glicosídicas, estáveis a um pH elevado e hidrolisáveis em pH baixo. A fração amilose, constitui-se por ligações α 1-4 sendo um polímero linear, podendo conter de 350 a 1000 unidades de glicose e formada por pontes de hidrogênio entre as hidroxilas das moléculas de glicose (Figura 4). Essa fração, geralmente, corresponde a 30% da massa total do amido. (MAAREL *et al.*, 2002).

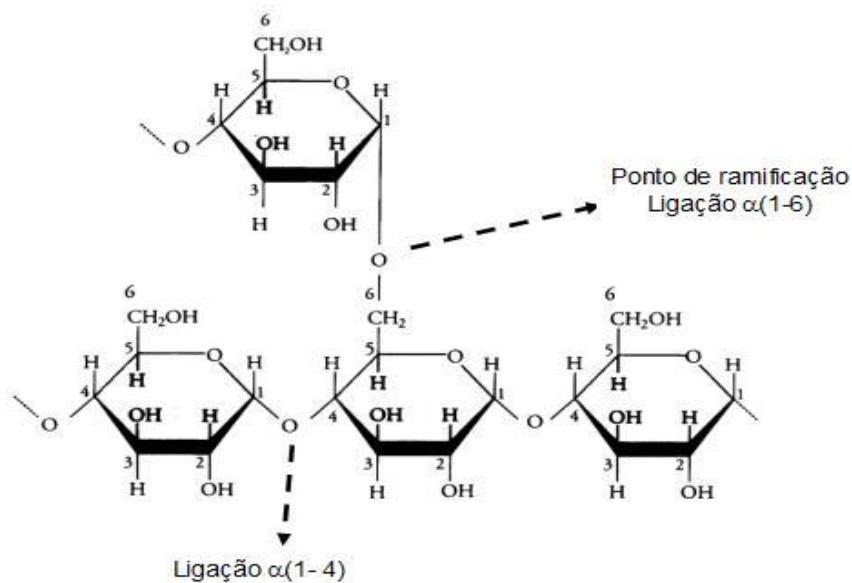
Figura 4 – Representação estrutural da amilose



Fonte: Adaptação de Ribeiro e Seravalli (2007).

A fração de amilopectina consiste em cadeias lineares com ligações α , 1-4 de 20-25 unidades de α -D- glicose e cadeias α , 1-6, por ligações glicosídicas com 10-500 unidades de glicose e o número médio de pontos de ramificação em amilopectina é de 5% (Figura 5). (MAAREL *et al.*, 2002; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). Essa fração possui massa molar na faixa de 10^7 - 10^9 g/mol. A maioria dos amidos contém 60-90% de amilopectina em massa. (COPELAND *et al.*, 2009).

Figura 5 – Representação estrutural da amilopectina



Fonte: Adaptação de Ribeiro e Seravalli (2007).

Tanto para a amilose como para a amilopectina, o número de resíduos de glicose, o número médio de pontos de ramificação e o teor de amilose podem variar de acordo com a origem botânica e o grau de maturação. (COPELAND *et al.*, 2009). O conteúdo de amilose é muito variável conforme a fonte vegetal (Tabela 3). (RIBEIRO; SERAVALLI 2007;

WROLSTAD *et al.*, 2005). A síntese do amido nos plastídios, em folhas, e no amiloplasto ocorre na fotossíntese. (MAAREL *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Teor de amilose (%) de algumas variedades botânicas de amidos em relação ao teor total de amido

Amido	Amilose* (%)
Milho	25
Arroz	16
Batata	24
Ervilha forrageira	43,7
Aveia	23,1
Trigo	24

Fonte: adaptado de Ribeiro e Seravalli (2007) ; Wrolstad et al. (2005).

A cristalinidade dos grânulos de amido apresenta estrutura organizada na forma de conjuntos (clusters), um modelo de conformação estrutural de amilopectina, as quais são compactas e alternadas com regiões amorfas, altamente ordenadas, de cadeias dispostas em paralelo, com regiões menos ramificadas. (CINELLI, 2012).

Na gelatinização do amido, o aquecimento do amido faz com que as moléculas comecem a vibrar com maior intensidade ocasionando a quebra das pontes de hidrogênio intermoleculares, permitindo a entrada de água nas micelas. Quando o aquecimento é contínuo, em uma quantidade abundante de água, pode resultar na perda total das zonas cristalinas, o desaparecimento da birrefringência e a transparência do amido. (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Outro fenômeno decorrente da mudança de temperatura é a retrogradação do amido, o qual consiste na reaproximação das moléculas pela redução de temperatura durante o resfriamento do gel, com formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, formação de zonas cristalinas e sinérese. Além disso, resulta na redução de volume, aumento na firmeza do gel e sinérese, tornando-o irreversível, insolúvel em água e resistente ao ataque enzimático. (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Em pesquisa de Barros e Jardine (2009), as moléculas de polissacarídeos (amido) presentes nas sementes de milho, basicamente são os carboidratos, os quais constituem unidades de glicose que sofrem interação formando volumes compactados de carboidratos com baixa dissolubilidade em água. Esse amido não é tão facilmente separável, pois a presença concomitante de proteínas parcialmente solúveis durante sua extração do amido acarreta em problemas na sedimentação e separação, devido à formação de espumas e aglutinação.

O amido é o principal hidrato de carbono do milho equivalente a 72-73% do núcleo. (SANDHU; SINGH; LIM, 2007). A composição química de uma molécula de amido de milho

é formada por lipídeos, proteína, amilose, amilopectina, açúcar redutor e carboidrato (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição química de uma molécula de amido de milho

	(g kg ⁻¹) Myat e Ryu (2014)	(g kg ⁻¹) Teixeira et al.(1998)	(g kg ⁻¹) Weber; Collares-Queiroz e Chang (2009)
Lipídeos	2,20	4,40	1,2
Proteína	5,59	3,30	0,5
Amilose	311,99	255,00	278,00
Amilopectina	699,01	745,00	722,00
Açúcar redutor	0,68	*	*
Carboidratos	843,54	*	*

Nota: (*) Autor não cita os valores.

Para Spier *et al.* (2013), a composição de amilose linear e amilopectina ramificada, respectivamente é de 25% e 75%.

Os grânulos que formam o amido possuem forma angular e variam entre 5 e 26 µm com um diâmetro médio de 15 µm. (SINGH *et al.*, 2003). Para Weber; Collares-Queiroz e Chang (2009), o amido de milho contém entre 25-28% de amilose, enquanto o de mandioca possui apenas 17%.

No milho há três tipos de amidos que podem ser encontrados e/ou produzidos: normal, ceroso e com alto teor de amilose. (PINTO, 2009). Esses amidos, por apresentarem diferentes teores de amilose, possuem propriedades funcionais distintas. Para o amido normal de cereais, o teor de amilose é encontrado em intervalos de 20-30%, sendo o mais utilizado em indústrias de alimentos; já o amido ceroso apresenta maior estabilidade a baixas temperaturas por não possuir praticamente amilose e os de alto teor de amilose (*high-amilose*) apresentam morfologia semelhante ao amido de milho normal. Esses apresentam superfície mais rugosa, as quais gelificam e formam filmes com facilidade, usados, principalmente, em produtos como *nuggets* e na indústria de balas de goma. (WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009).

No processo de extração do amido, a presença de lipídeos é um fator negativo, pois reduz a solubilidade do amido em água, altera as propriedades reológicas e funcionais, diminui a capacidade de inchaço, aumenta a temperatura de gelatinização, reduz à rigidez do gel, causa retardamento na retrogradação e menor suscetibilidade a hidrólise enzimática. (COPELAND *et al.*, 2009).

Para extrair o amido de milho existem dois tipos de moagem, a saber: por via úmida e via seca. (SANCHEZ; CARDONA, 2008). Na via úmida, ocorrem vários processos físicos, bioquímicos e mecânicos para separar as frações do milho e seus componentes básicos: germe,

fibra, amido e proteína (glúten). (LOPESFILHO, 1999). Ao contrário, na moagem a seco, os grãos não são fracionados, todos seus nutrientes entram no processo e concentram-se em coprodutos, resultados do processo de destilação e destinados à alimentação animal. (SANCHEZ; CARDONA, 2008).

3.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática é capaz de ser desenvolvida em condições brandas de temperatura e de concentração iônica existentes e necessárias aos processos celulares. (REGULY, 1996).

Em matérias-primas, indiretamente, fermentescíveis para a produção de etanol, na hidrólise, processo preliminar ao fermentativo, além da água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas. Esse processo pode ocorrer em duas formas variadas: via enzimática ou química. A primeira utiliza duas enzimas, uma para a liquefação e outra na sacarificação do amido. A segunda, é conhecida por hidrólise química, as quais utilizam ácidos sulfúrico e clorídrico para realizar o processo. (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial. A hidrólise enzimática tem sido muito utilizada pelas indústrias na produção de etanol de amiláceos, sendo sua principal característica a especificidade quanto à reação e ao substrato. (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

Para a eficiência desse processo, a concentração de enzimas utilizadas e as condições físicas são de suma importância, pois se forem excessivas ou drásticas, poderão comprometer a conversão do açúcar em álcool. (MENEZES, 1980).

Sendo um polissacarídeo, o amido é um carboidrato de reserva, uma vez que a macromolécula não pode penetrar na célula através da membrana celular (glicólise). A reserva amilácea dos grãos é hidrolisada pelas enzimas, transformando-o em açúcares simples, redutor, prontamente utilizável. (REGULY, 1996).

Durante o processo enzimático do amido, utilizam-se enzimas para a liquefação e sacarificação do amido convertendo-o em açúcares. A α -amilase é uma endoamilase que hidrolisa ligações (1,4) α -D-glicose em polissacarídeos amídicos. (MAAREL *et al.*, 2002). Este processo é parcialmente hidrolisável, no qual, o amido transforma-se em dextrinas e polímeros menores. Caracteriza-se por rápida diminuição da opacidade e da viscosidade das dispersões do amido promovendo a liquefação. A faixa de pH ótima para a atuação da α -amilase varia entre

4,7 e 5,4 e utiliza-se esse tipo de enzima em indústrias de fermentação para álcool, onde ocorre uma pré-hidrólise no amiláceo a ser sacarificado, tornando-o passível de agitação e bombeamento, pela prévia liquefação. (REGULY, 1996). Na etapa de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa e submetidos a altas temperaturas (90 – 105°C) para que ocorra a gelatinização. (MAAREL *et al.*, 2002).

Para completa hidrólise, a próxima etapa é a da sacarificação que resulta em uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose. A solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por meio da enzima sacarificante a glucoamilase, que hidrolisa ligações (1,4) e (1,6) α -D-glicose nas extremidades não redutoras de polissacarídeos completando o processo na transformação em glicose. (MAAREL *et al.*, 2002; NOVOZYMES, 2015). A glucoamilase é uma enzima extracelular e seu ataque é do tipo exotérmico, atuam na faixa de pH entre 3,0 e 5,5 tendo como atividade ótima no pH de 5,0 e maior estabilidade entre 4,0 e 5,0. A temperatura ótima é entre 50 e 60°C, sendo que a glicose é produzida diretamente, sem formação intermediária de dextrinas, maltose e isomaltose. Quando as duas fases são operadas por enzimas, diz-se que a hidrólise do amiláceo foi pelo sistema enzima-enzima. (REGULY, 1996).

Em materiais amiláceos, por exemplo, os hidrolisados produzidos a partir de milho apresentam propriedades similares dos hidrolisados de mandioca. (CAMILI, 2010).

Para avaliar o rendimento do processo de hidrólise deve-se levar em conta a progressão do tempo utilizado. Quanto maior a duração da sacarificação, maior será a conversão em açúcar e o rendimento da sacarificação é calculado a partir da estequiometria, pela qual 100 kg de amido rendem 111,1 kg de glicose. (REGULY, 1996).

3.9 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação é conhecida e praticada pela humanidade há milhares de anos, mesmo antes de conhecidos os princípios científicos. (EL-MANSI *et al.*, 2007). Estima-se que em 1789, Lavoisier foi o pioneiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica, que além do álcool e gás carbônico encontrou o ácido acético. (MENEZES, 1980).

Bioquimicamente, a fermentação é uma manifestação fisiológica da célula viva e ocorre o catabolismo de matéria orgânica por meio de reações acopladas ocasionadas pela ação desses micro-organismos e estão relacionados pelo consumo de substratos orgânicos propiciando a formação do produto. (REGULY, 1998). A utilização de nutrientes para essa formação pode ser realizada a partir de açúcares, amido ou celulose. (REGULY, 2000).

Seu desempenho pode ser relacionado a diversos fatores como pH, nutrientes, tipo de organismo, entre outros. (ORTIZ; SIMIONATTO; BARROS, 2014). O carbono, principal componente utilizado para produção de etanol, é utilizado também na formação de biomassa e dos coprodutos da fermentação. (EL-MANSI *et al.*, 2007).

A formação do álcool ocorre por síntese biológica pela ação de células de leveduras em meio anaeróbico, isto é, com sua respiração (oxidação aeróbia) interrompida, pois não encontra condições otimizadas de crescimento e reprodução, formando álcool e CO₂. (REGULY, 1996).

A principal via metabólica envolvida na fermentação do etanol é a glicólise, por meio da qual uma molécula de glucose é metabolizada, e duas moléculas de piruvato são produzidas. Em uma segunda fase, ao mesmo tempo o aldeído é reduzido a etanol e o NADH é oxidado a NAD⁺, reação catalisada por uma desidrogenase alcoólica. (WELL, 2000).

Para que ocorra a ação das leveduras, os mostos devem ser ajustados, para fornecer às leveduras um substrato otimizado, que possam transformar rapidamente em álcool. A concentração do teor alcoólico resultante da fermentação é entre 8 a 9% em volume, ou seja, 8 a 9 graus Gay-Lussac. O densímetro de Gay-Lussac é graduado em escala, que indica diretamente a % em volume em 100 volumes de solução. (REGULY, 1996).

Um fator positivo no processo de fermentação é a adição de alguns nutrientes no mosto a fim de elevar a eficiência osmótica do processo. Para uma adequada fermentação alcoólica, cada um deles possui concentrações ideais, como por exemplo, o fósforo (62-560 mg L⁻¹), potássio (700 -800 mg L⁻¹), magnésio (70-200 mg L⁻¹), sódio (200 mg L⁻¹), ferro (0,2 mg L⁻¹), zinco (0,5-10 mg L⁻¹), entre outros. (DÍAZ-HELLÍN *et al.*, 2013; CAMILI, 2010).

A avaliação do rendimento do processo fermentativo depende do controle das etapas na fermentação e poderá ser determinada de maneira individual, incluindo a determinação da eficiência durante a hidrólise em amiláceas, etapa preliminar a fermentação. Outro aspecto é a natureza do substrato e o conhecimento de sua composição. Uma forma de se calcular a eficiência do processo na obtenção do etanol é relacionar o teor alcoólico obtido na destilação com o valor teórico a partir da equação de Gay-Lussac. (MENEZES, 1980).

O cálculo do álcool correspondente depende de relações estequiométricas estabelecidas pela equação de Gay-Lussac para o amido (C₆H₁₀O₅) $n = nC_6H_{12}O_6 - nH_{20} = n(2C_2H_5OH + 2CO_2)$. Para tal, o rendimento teórico calculado é de 100 g de amido que correspondem a 111,11 g de glucose e 56,79g de álcool a 100%. Quando se considera o substrato formado de glucose, esse açúcar é definido como açúcar redutor total e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de açúcar. (REGULY, 1998).

Para avaliar a concentração de açúcares no mosto de forma que o álcool produzido não exceda a tolerância da levedura são utilizados densímetros com escala Brix e recomenda-se estabelecer como rotina, nas usinas que fermentam amiláceos, por exemplo, a correlação entre açúcares fermentáveis e grau Brix. Para o caldo de cana, por exemplo, recomenda-se trabalhar de 14 a 18 °Brix. (REGULY, 1998).

A molécula da glicose passa por um processo anaeróbico por doze etapas intermediárias antes de ser transformada em etanol e gás carbônico. Os álcoois superiores e ácidos são formados durante a fermentação em proporções pequenas pela ação de leveduras sobre os aminoácidos presentes no mosto. (AQUARONE; LIMA; BONZANI, 1993).

Os processos de fermentação alcoólica utilizam diferenciadas cepas selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As principais operações no processo de produção de álcool dependem do substrato utilizado e consiste em cinco etapas: preparação do substrato, correção do mosto, preparo do inóculo, fermentação e destilação. (MENEZES, 1980).

A avaliação da fermentação alcoólica, a velocidade de formação da matéria prima amilácea em etanol e os fatores que podem influenciar nesta velocidade é feita pelo estudo da cinética da fermentação. A formação de etanol ocorre em paralelo com o crescimento da levedura e o consumo de açúcar e na fermentação descontinua há três fases características: a fase preliminar, de duração variável, eliminada conforme o processo de inoculação, no caso da utilização de leveduras liofilizadas. A fase principal ou tumultuosa inicia-se com o desprendimento de CO₂ e se caracteriza pelo aumento exponencial de etanol e pela correspondente diminuição da densidade Brix ou concentração de açúcar. A duração desta fase é 30 a 36 horas. A última fase é a complementar, na qual cessa o desprendimento de CO₂ a densidade diminui e ocorre a diminuição de espuma. O tempo total de fermentação varia entre 48 e 54 horas, o que difere do processo com mostos de caldo de cana no qual a duração total varia entre 20 a 24 horas. (REGULY, 1998). Para Menezes (1980), o tempo total de fermentação para o mosto de substâncias amiláceas, geralmente, é de 36 horas e a ocorrência de interferentes durante o processo (como inóculo pouco ativo ou teor excessivo de açúcar inicial do mosto, reaproveitamento do inóculo, reaproveitamento de leveduras) podem ser prejudiciais ao rendimento e qualidade do álcool.

Os processos de condução de fermentação alcoólica podem ser classificados em descontínuos e contínuos. A fermentação descontínua ou “em batelada” ocorre em dornas individuais e não ligadas entre si. Dentro desse tipo de fermentação alguns processos são utilizados como a reutilização ou reaproveitamento do pé de cuba, no qual terminada a fermentação, as leveduras são decantadas durante três a quatro horas e de 20 a 25% são

encaminhadas à dorna servindo de pé de cuba para a próxima fermentação. Isso deve ser observado a cada reutilização, pois quando aparecerem sintomas como alteração de pH ou o aumento no aspecto das espumas e o cheiro, este não deve ser usado novamente. (REGULY, 1998).

Outro processo é a utilização de fermentos individuais, sendo utilizado inóculo novo a cada batelada, mais seguro quanto à pureza do inóculo. Ao término da fermentação, a levedura é retirada por filtração ou centrifugação, em seguida é seca e moída para utilização na adição de rações. O processo de cortes é eficiente para mostos de melaços, usando como inóculo de uma dorna parte do mosto em fermentação, geralmente metade, da batelada precedente. Assim, corta-se a fermentação de uma dorna quando o teor de sólidos solúveis se reduzir à metade e utiliza na dorna vizinha completando-a com o mesmo volume da anterior com o mosto reajustado e corrigido. Esse processo pode acarretar quedas no rendimento. (REGULY, 1998).

O último é a recirculação das leveduras, conhecido como processo de Melle-Boinot, que se faz uso de centrifugação de todo o mosto fermentado, com a finalidade de separar as células de leveduras para reaproveitá-las nas próximas bateladas. As vantagens desse processo são a economia de açúcar, tempo, aumento no rendimento em álcool; as colunas de destilação sujam menos, as células podem ser conservadas sob refrigeração; economia no número de fermentadores e menor risco de infecção. Mas, os altos custos de centrifugação, além da sua manutenção estão em contrapartida. (REGULY, 1998).

O processo contínuo de fermentação alcoólica pode ser conduzido com uma ou mais dornas ligadas em série. Esta ocorre quando há formação do produto a partir do cultivo de micro-organismos em um sistema no qual se pode manter o cultivo microbiano permanentemente em crescimento, por contínua adição de meio nutritivo, de modo a não alterar o ambiente celular. Esse fermentador fornece ótimas condições de avaliação a resposta dos micro-organismos ao seu meio e tem como vantagens a economia de tempo de carga, descarga e limpeza de dornas, economia de equipamento e vapor, possibilidade de tornar o processo inteiramente contínuo (desde a matéria-prima até a destilação), maior facilidade de operação, reduzindo mão de obra e maior uniformidade do produto. As desvantagens são a potencialidade à contaminação pelo tempo de funcionamento e a necessidade contínua de supervisão e aferição da instrumentação de controle e automação. (REGULY, 2000).

As leveduras são fungos unicelulares e agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação. Podem ser esféricas, ovais, apiculadas, elípticas ou triangulares e se reproduzem principalmente por brotamento. O tamanho e largura podem variar de 2 a 20 μ m e 1 a 9 μ m respectivamente. A maioria dos fungos apresenta uma fase unicelular e outra filamentosa,

alternando a forma de acordo com condições ambientais. (BONATO *et al.* 2015; SIQUEIRA, 1995 e MENEZES, 1980). São seres mesófilos que crescem e metabolizam entre 28 e 38 °C.

Na fermentação alcoólica, as espécies de maior interesse industrial são as *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* e *Saccharomyces fragilis*, utilizadas na produção de álcool e de bebidas alcoólicas em geral. Na produção de vinhos, utiliza-se a *Saccharomyces uvarum* e na produção de cervejas a *Saccharomyces cerevisiae*. As *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas devido à tolerância a altos teores de etanol e a velocidade de fermentação. Outro agente fermentador muito pesquisado e utilizado para a produção de álcool é a bactéria *Zymomonas mobilis*. (REGULY, 1998).

Na utilização das leveduras, a escolha da linhagem apropriada influencia na eficiência da fermentação e os critérios utilizados são a velocidade de fermentação (rápida conversão de açúcar em álcool), alto rendimento, resistência ao álcool, tolerância à pressão osmótica do meio, eficiência na conversão, resistência ao pH e antissépticos e estabilidade genética. (MENEZES, 1980; REGULY, 1998).

A tolerância do álcool está limitada, pois maior tolerância ao álcool reduz custos de destilação, por economia energética. A limitação da quantidade de álcool é importante, pois inibe as leveduras, então, utiliza-se valor máximo de 110 g de etanol/litro ou 137 ml/litro de mosto corresponde ainda a 13,7 ° GL. Quanto ao pH, a tolerância é na faixa de 4 e 6, esse pH baixo inibe o crescimento bacteriano, havendo menor perigo de contaminações. (REGULY, 1998).

Durante o processo, algumas etapas são essenciais para aperfeiçoar o desempenho das leveduras tornando-o mais eficiente e econômico. O preparo do inóculo consiste na quantificação de levedura em atividade suficiente para assegurar a fermentação. Após a adição do inóculo, a segunda etapa é a condução da fermentação alcoólica, caracterizada pela multiplicação da levedura, formando novas células a uma pequena elevação da temperatura durante uma fase de duração curta. A atividade fermentativa só ocorre quando há desprendimento de gás carbônico evidente e é finalizada quando há a queda na intensidade de evolução do dióxido de carbono ocasionando o consumo de açúcar pelas leveduras. (MENEZES, 1980).

3.10 ETANOL A PARTIR DE FONTES AMILÁCEAS

O milho é a matéria-prima de alto valor devido ao álcool fino e puro que sua fermentação proporciona. (RASOVSKY, 1973).

O processo de moagem de milho a seco é o método mais utilizado nos Estados Unidos para a geração de etanol por fermentação de grãos e consiste nas etapas de gelatinização, liquefação e de sacarificação. (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006; MYAT; RYU, 2014).

Primeiramente, o grão é moído e misturado com água para formação do mosto e submetido a temperatura entre 90 e 150 °C, por cerca de 20 minutos, utilizando a enzima α amilase para que ocorra a gelatinização. Durante essa etapa térmica ocorre o aumento acentuado da viscosidade, rapidamente diminuída quando ocorre a hidrólise enzimática. (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006; SPIER *et al.*, 2013; CINELLI, 2012).

No processo de liquefação por enzimas, a massa de milho é convertida em açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática, onde ocorre a quebra das ligações glicosídicas da macromolécula do amido contido no milho, obtendo-se uma alta concentração de glicose fermentada. (PIERAGOSTINI; AGUIRRE; MUSSATI, 2014). E por fim, na sacarificação, o mosto é resfriado, normalmente até 60-65 °C, e são adicionadas as glucoamilases, para converter os oligossacarídeos em glicose. (CINELLI, 2012).

Após o processo de hidrólise, inicia-se fermentação com a adição de inóculo de levedura. A mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae* (30-35 °C). O tempo total de fermentação é aproximadamente de 36 horas. (SANCHEZ; CARDONA, 2008; MENEZES, 1980).

O resíduo da coluna de destilação contém quantidade considerável de água, material não fermentável, produtos químicos produzidos durante a fermentação, bem como alguns compostos produzidos por meio de reações químicas devido às altas temperaturas. (PIERAGOSTINI; AGUIRRE; MUSSATI, 2014).

A recuperação do etanol da coluna é realizada por meio da ação combinada de retificador de remoção e peneiras moleculares e 99% do etanol sai do topo do retificador como destilado. O destilado do retificador, contendo principalmente o etanol, alimenta as peneiras moleculares e captura a última fração de água, criando 99,6% de etanol puro. (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizados como matérias-primas oito cultivares de milho crioulos produzidos por agricultores de base familiar em duas cidades na área de atuação do Laboratório de Mecanização Agrícola (Lama) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A coleta foi realizada na safra de 2014/2015, região Centro-sul do estado do Paraná, nos Municípios de Palmeira e Teixeira Soares, em diferentes propriedades (Tabela 5). Essa região apresenta clima tipo Cfb (classificação climática de Koeppen), temperado, verões frescos, sem estação seca definida e inverno com geadas frequentes. (CAVIGLIONI *et al.*, 2000).

Tabela 5 – Identificação da cidade e estado de origem das populações crioulas de milho

Denominação popular da cultivar	Cidade/ Estado	Localização Sede - UTM 22J	
		X(m)	Y(m)
Amarelão	Teixeira Soares/Paraná	568.367,73	7.197.485,15
Caiano	Teixeira Soares/Paraná	555.270,23	7.200.324,02
Cunha	Teixeira Soares/Paraná	568.367,73	7.197.485,15
Rajado	Teixeira Soares/Paraná	568.367,73	7.197.485,15
Branco	Palmeira / Paraná	589.337,51	7.178.290,02
Carioca	Palmeira/Paraná	589.337,51	7.178.290,02
Palha roxa	Teixeira Soares/Paraná	568.367,73	7.197.485,15
Branco	Teixeira Soares/Paraná	568.367,73	7.197.485,15

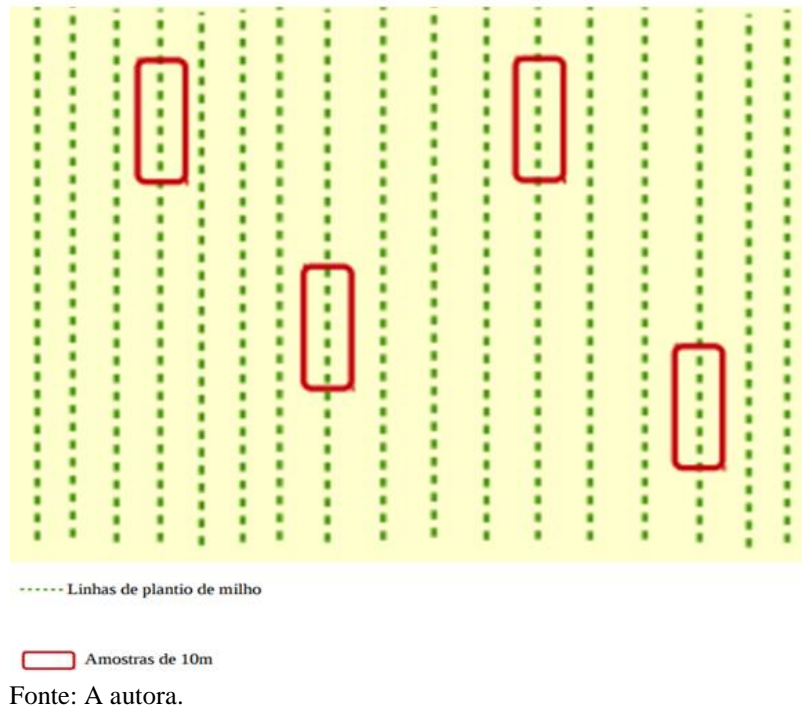
Nota: Os valores de X e Y são as coordenadas geográficas referente a localização das propriedades.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE CAMPO

Para caracterização do sistema produtivo foi realizada entrevista com produtor responsável. Nesta, foram questionados rotação de culturas, insumos e tratamentos culturais utilizados.

Para descrever os cultivares, bem como seus comportamentos, considerando o efeito da heterogeneidade do terreno e do ambiente, delimitaram-se de 4 a 6 linhas de semeadura, de 10 metros, de maneira aleatória na unidade de produção como esquematizado na Figura 6. Na 1ª visita realizada duas a três semanas após semeadura, foram demarcadas com fita plástica, para acompanhamento e colheita.

Figura 6 – Linhas de plantio e amostragem das plantações de milho na safra de 2014/2015



Para caracterização do sistema produtivo e das cultivares propriamente ditas, foram realizadas visitas às áreas em três fases.

Primeiramente, duas a três semanas após a semeadura, determinou-se a densidade ou população de plantas.

Durante o enchimento do grão (de grão leitoso até a formação de milho verde), avaliou-se a altura da planta, a altura de inserção da primeira espiga e o tombamento (número de plantas tombadas).

Após a colheita, avaliou-se a massa média de grãos por espiga, de espigas por planta e por meio destes dados calculou-se o rendimento da produção (kg ha^{-1}).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO CRIOULO

Após a colheita, realizou-se a retirada das brácteas da espiga e debulha dos materiais manualmente. Os grãos foram secos em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco dias. Em seguida, foram fracionados, com a separação do gérmen do endosperma, em máquina comercial, vulgarmente denominada de canjiqueira de facas.

Após fragmentação pelas facas, os grãos foram peneirados e separados por peso específico e tamanho.

De posse das amostras de endosperma e de gérmen, realizou-se a moagem em moinho de rotor tipo ciclone modelo STAR FT 51 regulado para moagem fina, utilizando peneira de abertura 45 ABNT/ASTM. Para conservação, após moagem, as amostras foram liofilizadas.

Para determinar o teor de cinzas utilizou-se método de incineração em mufla a 600°C. Na determinação da proteína bruta utilizou-se método de Kjeldahl. (AOAC, 2000), fator de correção de 6,25.

A determinação do pH foi realizada pelo método 017/IV. (IAL,2008). O conteúdo de lipídeos foi determinado por extração pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano. (IAL, 2008). Também foram analisados os teores de fibra bruta, (SILVA, 2002), amido pelo método enzimático (DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001), açúcar redutor total conforme Somogyi-Nelson, (adaptado por DEMIATE *et al.*, 2002) e amilose total em amido (WROLSTAD *et al.*, 2005).

Como forma de caracterização visando outros processos industriais, determinou-se a estabilidade térmica. Esta foi avaliada por termogravimetria (TG/DTG), utilizando-se equipamento SHIMADZU, modelo TGA-50 e o programa TA-60WS. As análises foram realizadas em cadinho de alumina aberto, com velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de ar de 150 mL min⁻¹, no intervalo de temperatura de 15 °C a 650 °C. (SIQUEIRA *et al.*, 2015). As vantagens na análise termogravimétrica são a rapidez e necessidade de menor quantidade de amostra. (LEIVAS *et al.*, 2012).

Para avaliação superficial morfológica dos grânulos utilizou-se o equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura com efeito de campo (MEV-FEG), marca TESCAN, modelo MIRA 3, e para a composição elementar utilizou-se detector EDS (espectrômetro de raios-x de energia dispersiva) da marca Oxford instruments, modelo X-ACT. As amostras foram acondicionadas em porta amostra e aderidas em fita de carbono para posterior metalização com liga ouro com paládio utilizando-se um *sputtering*, marca Quorum, modelo SC 7620.

4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para converter a quantidade de amido presente no endosperma em açúcar, as amostras foram submetidas à hidrólise e sacarificação, por suspensão de amostra em água na proporção de 30% (CAMILI, 2010).

Para determinar os parâmetros de tempo de ação das enzimas nas etapas de hidrólise e sacarificação sobre o efeito da concentração de enzimas foram realizados testes preliminares

partindo da concentração e parâmetros indicados pelo fabricante (pH e temperatura de atuação da enzima).

As enzimas hidrolíticas utilizadas no processo foram enzimas comerciais produzidas pela Novozymes S/A. Na etapa de dextrinização utilizou-se a enzima comercialmente conhecida como Termamyl 2X, uma α -amilase termoestável. O pH ótimo de ação enzimática está entre 6 e 8 e temperatura de 90 a 105°C, devendo-se adicionar no meio de reação de 30 a 60 mg kg⁻¹ de cálcio a fim de otimizar a atividade da enzima. Na etapa de sacarificação, a enzima é AMG 300, esta é uma amiloglucosidase, O pH ótimo de ação enzimática está entre 4 e 4,5 e temperatura de 58 a 60 °C. (NOVOZYMES, 2015).

Neste trabalho para a obtenção dos hidrolisados os ensaios foram realizados em autoclave e utilizou-se 50 g de substrato de amostra previamente moída e peneirada, a fim de aumentar a superfície específica da amostra e facilitar ataque das enzimas amilolíticas.

O processo teve como base o método de Torres; Leonel e Mischán (2012) com algumas adaptações. Adicionou-se 180 mL de água deionizada formando uma suspensão com pH 6,0. Na próxima etapa, foi adicionado 1/3 da quantidade da enzima Termamyl 2X (34 μ L) e 15 mL de solução de cloreto de cálcio. O processo foi realizado em erlenmeyer fechado com algodão e papel kraft. A mistura foi colocada em autoclave, por 1 hora e temperatura de 105°C. Após esse tempo, adicionou-se 2/3 da enzima Termamyl 2X (66 μ L). Em seguida, manteve-se por mais 2 horas em autoclave nas mesmas condições. Posteriormente a dextrinização, resfriou-se a amostra e ajustou-se o pH do mosto 4,5, com uso de ácido acético a 0,2 mol L⁻¹.

Para realização da sacarificação, adicionou-se 160 μ L da enzima amiloglucosidase (AMG 300) dissolvida no mosto. O ensaio de digestão enzimática foi realizado em banho-maria tipo Dubnoff (modelo TE-053 da marca TECNAL), por 48 horas na temperatura de 60°C.

Após o período de sacarificação, para remoção de impurezas (fibras), o mosto foi centrifugado em centrífuga (modelo Rotina 420R da marca Hettich, Tuttlingen) e filtrado com auxílio de tecido em bomba a vácuo (modelo TE-058 da marca TECNAL). Após cada ensaio de hidrólise, os hidrolisados foram congelados para posterior fermentação.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS HIDROLISADOS

Foram realizadas as seguintes análises nos hidrolisados: concentração de açúcares, pH, °Brix com descrição a seguir e avaliação de superfície por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).

4.5.1 Determinação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As concentrações de açúcares presentes nos hidrolisados obtidos após cada ensaio foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As seguintes condições foram empregadas: coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300x 7.8 mm), precedida por uma pré-coluna catiônica Cátion-H (Bio – RAD), sob condições isocráticas; coluna e detector de índice de refração na temperatura a 30 °C; eluente solução de ácido sulfúrico 3,0 mmol L⁻¹, preparada em água ultra-pura (Milli-Q Integral ®, Millipore®, São Paulo, Brasil) e filtrada em filtro de nylon de 45µm. A injeção foi de 10 µL sob um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando *software* Empower®. Os resultados foram comparados com o tempo de retenção dos padrões de referência. A curva de calibração de açúcar utilizada foi a D-glicose. (FARIAS, 2015).

4.5.2 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado por potenciômetro, marca Labmeter, modelo PH2, em 10 mL das amostras a uma temperatura de 20 °C e com o aparelho previamente calibrado. (IAL, 2008).

4.5.3 Determinação de Sólidos Solúveis (°Brix)

As concentrações de sólidos solúveis nas amostras de hidrolisados foram determinados em refratômetro de bancada Hand-Held Refractometer, marca ATAGO.

4.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Após a hidrólise foi realizada a fermentação, sendo que os seguintes parâmetros foram avaliados o efeito do tempo (h) e das concentrações de levedura. Durante o processo, foram retiradas alíquotas para determinação do teor alcoólico.

Nos ensaios, utilizou-se como inóculo a levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae*, comercialmente denominada Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast fornecida pela LNF - Latino Americana LTDA. Seguindo orientações do fabricante, utilizou-se hidratação de 30 minutos e agitação antes da adição ao mosto. A temperatura durante o processo foi entre 30 °C a 35 °C.

4.6.1 Ensaio para o processo fermentativo

O processo fermentativo ocorreu de maneira descontínua e os experimentos foram realizados em fermentadores anaeróbios. Após a fermentação, determinou-se o °Brix das amostras.

O volume obtido foi diluído a 18 °Brix, resultando em um volume final de 200 mL, 211,11 mL, 222,22 mL, 233,33 mL e 244,44 mL de mosto. Em seguida adicionou-se 0,05 g L⁻¹ de ureia como fonte de nitrogênio e pH 4,5. A concentração de levedura utilizada foi de 0,0020 g mL⁻¹, 0,0021 g mL⁻¹, 0,0023 g mL⁻¹, 0,0024 g mL⁻¹ e 0,0025 g mL⁻¹ de acordo com cada amostra. Após diluição, as amostras foram agitadas, manualmente, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se o inóculo ao mosto. Posteriormente, os fermentadores ficaram em estufa a temperatura de 35 °C por 32 horas. Ao fim da fermentação, utilizou-se centrífuga para recuperar o fermentado e remoção da levedura (REGULY, 2000).

4.6.2 Determinações analíticas dos ensaios fermentativos

Após a fermentação, foram determinados os teores de açúcares residuais e teor de etanol dos cultivares de milho crioulo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.6.2.1 Determinação de biomassa seca

Considera-se biomassa seca o residual da fermentação, do qual a levedura é removida no processo de centrifugação. Para tal determinação, as amostras, ao fim da fermentação, foram centrifugadas em centrífuga Rotina 420R (Hettich, Tuttlingen, Alemanha) durante 10 minutos a 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado para posteriores análises, e o resíduo da levedura decantada foi transferido para cadinho previamente pesado e calcinado em mufla modelo Jung 2810. Para evitar possíveis erros analíticos, como sólidos solúveis, adicionou-se água destilada para auxiliar na retirada dos precipitados. Os cadinhos com o residual da fermentação foram mantidos em estufa a 105 °C por 24 horas, foram retirados e acondicionados em dessecador até o resfriamento, para posterior pesagem. (FARIAS, 2015).

4.6.2.2 Análise Cromatográfica de etanol por CLAE

As amostras foram filtradas em filtro de seringa de nylon de 0,22 µm (Waters, Milliford). A eluição isocrática consiste em uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,005 mol

L^{-1} e $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$. Para as análises utilizou-se coluna Bio-Rad HPX 87H ($300 \times 7,8 \text{ mm}$) e temperatura de $64 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados cromatográficos foram analisados através do *software* Empower®, sendo os resultados comparados com o tempo de retenção dos padrões de referência e a quantificação realizada por curvas de calibração (SANTOS, 2015).

4.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

A partir dos resultados provenientes da hidrólise e fermentação os parâmetros de fermentação foram calculados conforme descrito por Ribeiro e Horii (1999) e Farias (2015). Para determinação do ponto inicial dos parâmetros fermentativos retiraram-se alíquotas no momento em que o meio foi inoculado e homogeneizado, como descrito por Farias (2015). As equações utilizadas, segundo Farias (2015), estão descritas a seguir.

- Concentração celular produzida, Equação 1:

$$X = X_f - X_0 \quad (1)$$

Onde: X = concentração celular produzida ($\text{g matéria-seca L}^{-1}$);

X_f = Concentração celular final ($\text{g matéria-seca L}^{-1}$);

X_0 = Concentração celular inicial ($\text{g matéria-seca L}^{-1}$).

A concentração celular foi determinada por meio da biomassa seca, método exposto no item 4.6.2.1

- Açúcar consumido, conforme Equação 2:

$$S = - (S_f - S_0) \quad (2)$$

Onde: S = açúcar consumido (g L^{-1});

S_f = concentração final de açúcares (g L^{-1});

S_0 = concentração inicial de açúcares (g L^{-1}).

- Fator de conversão de substrato em biomassa, pela Equação 3

$$Y \frac{X}{S} = \frac{X}{S} \quad (3)$$

Onde: $Y \frac{X}{S}$ = Fator de conversão de substrato em biomassa

X= Biomassa produzida (g L⁻¹);

S= Substrato consumido (g L⁻¹).

- Etanol produzido, pela Equação 4:

$$P = P_f - P_i, \quad (4)$$

Onde: P = etanol produzido (g L⁻¹);

P_f = concentração de etanol final (g L⁻¹);

P_i = concentração de etanol inicial (g L⁻¹).

- Fator de conversão de substrato em etanol, pela Equação 5 :

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P}{S} \quad (5)$$

Onde: $Y_{\frac{P}{S}}$ = Fator de conversão de substrato em etanol

P = Etanol produzido (g L⁻¹);

S = Substrato consumido (g L⁻¹).

- A produtividade de etanol, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. Ao final de 36 horas de fermentação, a produtividade foi calculada pela Equação 6:

$$PR = \frac{P}{t} \quad (6)$$

Onde: PR = produtividade de etanol (g L⁻¹ h⁻¹),

t = tempo de fermentação (h);

P = Etanol produzido (g L⁻¹).

A eficiência da fermentação N_b (%), com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 g etanol → 100g glicose), foi determinada de acordo com a Equação 7:

$$N_b(\%) = \frac{Y_p}{0,511} * 100 \quad (7)$$

Para determinar a eficiência do processo N_p (%) com base na concentração inicial de açúcar S_0 e o rendimento em grama de etanol por grama de glicose ao final de 36 horas de fermentação, utilizou-se a Equação 8:

$$N_p(\%) = \frac{P * 100}{0,511 * S_0} \quad (8)$$

P = Etanol produzido ($g L^{-1}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CAMPO

O manejo agrícola da matéria-prima foi caracterizado a partir dos dados fornecidos pelos agricultores e visita às lavouras. Interessante ressaltar que apenas um dos cultivares utilizados, o agricultor adquiriu as sementes do cultivar do vizinho. Isto é, além da soberania, do baixo custo, os agricultores possuem sementes adaptadas edafoclimaticamente.

Antes da semeadura do milho, os agricultores utilizaram diferentes manejos. A maioria não utilizou cultura de inverno e somente um, que já participou de encontros agroecológicos e deseja obter certificação orgânica, realizou cultura de inverno, com cultura para cobertura (centeio) e cultura para fixação de nitrogênio (ervilhaca). Fica claro que mesmo com o uso de sementes crioulas, que esse tipo de escolha ainda é mais econômico que ideológico, no qual os produtores ainda utilizam fertilizantes sintéticos e solúveis, bem como dessecantes químicos (Tabela 6).

A data de semeadura, por fatores climáticos, variou de 10 de outubro a 20 de novembro de 2013. Como zoneamento agrônômico, somente dois cultivares Brancos estariam dentro do período recomendado que vai de 15 de setembro a 15 de outubro.

Na avaliação da população, observam-se valores que podem ser considerados baixos, com exceção dos cultivares Brancos. Embora não exista recomendação para esse de cultivar, existe certo consenso com população em torno de 50.000 plantas ha⁻¹. (MODENA-WUTZKI, 2014) (Tabela 6).

Tabela 6 – Manejo utilizado durante condução agrônômica das cultivares

Cultivares	Semente	cultura de inverno	Adubação	Manejo	data de semeadura	data de colheita	população (pl ha ⁻¹)
Amarelão	Própria	Pousio	punhado de NPK (10,20,20) por cova	Grade e carpido	25/10/13	18/03/14	43.333
Caiano	Vizinho	Azevém	não teve	Dessecado	28/10/13	18/03/14	46.428
Cunha	Própria	Pousio	punhado de NPK (10,20,20) por cova	Grade e carpido	06/11/13	28/03/14	43.750
Rajado	Própria	Pousio	punhado de NPK (10,20,20) por cova	Grade e carpido	06/11/13	28/03/14	41.111
Branco/Palmeira	Própria	Centeio e ervilhaca	Não teve	Grade e carpido	15/10/13	22/04/14	47.777
Carioca	Própria	Centeio e ervilhaca	Não teve	Grade e carpido	16/10/13	22/04/14	32.777
Palha Roxa	Própria	Pousio	punhado de NPK (10,20,20) por cova	Grade e carpido	20/11/13	28/03/14	35.555
Branco/Teixeira Soares	Própria	Pousio	punhado de NPK (10,20,20) por cova	Grade e carpido	10/10/13	28/03/14	54.375

Em segunda visita, no final do florescimento, foram determinadas altura da planta e a altura da inserção da primeira espiga. No momento da colheita, foi determinado o número de plantas tombadas e através das espigas colhidas, determinou-se a massa de grãos por espiga e produtividade (Tabela 7).

Geralmente, as plantas de milho crioula são altas, sendo consideradas baixas os cultivares Amarelão e Caiano. Devido a essa característica associada à altura de inserção da espiga (Tabela 7) é comum nestes cultivares, em final de ciclo, ou com algum evento de vento, sofrerem processo de tombamento ou acamamento.

Espigas com menos de 100 g de grãos podem ser consideradas pequenas e geralmente têm correlação com baixa fertilidade do solo ou competição com plantas espontâneas. (WEIRICH NETO, 2006). A massa de grãos por espiga dos cultivares Amarelão e Carioca podem ser considerados valores competitivos com híbridos comerciais em lavouras de alto investimento (Tabela 7).

Tabela 7 – Características agronômicas da planta e grãos dos cultivares crioulos

Cultivares	Altura planta (cm)	Altura espiga (cm)	Tombamento (%)	Massa média de grão por espiga (g)	Produtividade (kg ha ⁻¹)
Amarelão	224,17	126,67	0%	145,55	6307
Caiano	230,83	144,17	1%	76,59	2899
Cunha	302,50	198,33	27%	85,49	2992
Rajado	300,83	199,17	5%	103,16	3725
Branco/Palmeira	305,00	216,67	13%	124,05	4686
Carioca	282,50	182,08	10%	158,23	4835
Palha Roxa	271,67	156,67	1%	79,68	2611
Branco/Teixeira Soares	325,83	220,83	10%	102,83	4113

Os cultivares Palha Roxa, Cunha e Caiano apresentaram produtividades menores, enquanto o cultivar Amarelão apresentou produtividade elevada para este tipo de cultivar e investimento (MODENA-WUTZKI, 2014) (Tabela 7). No caso do cultivar Palha Roxa, o valor pode ser considerado muito baixo, afetado, segundo o produtor, pela semeadura realizada muito tarde (20/11/2013) e devido a um período seco no mês de janeiro quando o milho estava em florescimento. Para o cultivar Caiano, pela rotação utilizada, com azevém no inverno e sem aporte de qualquer tipo de fertilizante, esperava-se baixa produtividade.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE MILHO CRIOULO

Os resultados de caracterização dos grãos dos cultivares crioulos podem ser visualizados nas Tabelas 8 e 9.

Para o teor de lipídeos utilizou-se a massa relativa da fração gérmen (eixo embrionário); as outras análises foram realizadas considerando a fração endosperma do grão.

O teor de cinzas ou resíduo mineral encontrado nos cultivares teve variação entre 6,10 a 17,50 g kg⁻¹, mediana de 10,70 e desvio padrão de 3,60 g kg⁻¹. Em estudos em cinco variedades de milho cultivados em manejo orgânico, tem-se uma média de 14,10 g kg⁻¹. (HENZ *et al.*, 2013). Carvalho *et al.* (2004) encontraram valor médio de 12,5 g kg⁻¹. Já D'Agostini *et al.* (2004) encontraram em milhos híbridos valor médio de 10,8 g kg⁻¹. Em outros estudos, com híbridos, os valores encontrados foram de 15,50 g kg⁻¹, 11,2 a 14,2 g kg⁻¹, 15,6 g kg⁻¹ e 11,5 g kg⁻¹, respectivamente pelos autores Agustini *et al.* (2015), Gonçalves *et al.* (2003), Lucchin; Barcaccia e Parrini (2003) e Vieira *et al.* (2007).

Tabela 8 – Valores determinados de lipídeos, fibra bruta, proteína bruta e cinzas da matéria-prima dos cultivares de milho crioulo

	Lipídeos (g kg ⁻¹)	Fibra Bruta (g kg ⁻¹)	Proteína Bruta (g kg ⁻¹)	Cinzas (g kg ⁻¹)
Amarelão	63,10 ± 0,14	11,13 ± 0,03	55,50 ± 0,06	15,65 ± 0,18
Caiano	94,40 ± 0,18	9,70 ± 0,11	60,40 ± 0,08	6,10 ± 0,04
Cunha	60,30 ± 0,02	9,30 ± 0,02	73,50 ± 0,05	10,60 ± 0,10
Rajado	68,40 ± 0,13	6,70 ± 0,03	78,70 ± 0,13	10,30 ± 0,03
Branco/Palmeira	68,60 ± 0,13	8,20 ± 0,02	92,80 ± 0,07	17,50 ± 0,08
Carioca	72,60 ± 0,04	11,3 ± 0,10	81,20 ± 0,19	11,30 ± 0,20
Palha Roxa	68,50 ± 0,20	8,30 ± 0,01	83,10 ± 0,08	9,21 ± 0,05
Branco/Teixeira Soares	71,50 ± 0,12	13,2 ± 0,11	83,40 ± 0,08	10,80 ± 0,10
MÉDIA	70,93	9,73	76,08	11,42
MAIOR VALOR	94,40	13,20	92,80	17,50
MENOR VALOR	60,30	6,70	55,50	6,10
MEDIANA	68,55	9,50	79,95	10,70

Os resultados para proteína bruta entre os cultivares variaram entre 55,50 a 92,80 g kg⁻¹. Os valores diferenciados podem ser atribuídos à influência na adubação nitrogenada durante o cultivo (VIEIRA *et al.*, 2007). Os valores encontrados para os cultivares Amarelão, Caiano, Cunha e Rajado foram inferiores aos referenciados. Em vinte experimentos com milhos híbridos na Romênia, os resultados variaram de 77,2 a 126,2 g kg⁻¹ (DROCHIOIU *et al.*, 2016). Em outro estudo, com duas variedades de milho transgênicos na China, os valores encontrados foram de 122,6 e 107,8 g kg⁻¹, superiores ao encontrado nesta pesquisa. (TANG *et al.*, 2013). Henz *et al.* (2013) e Agustini *et al.* (2015) encontraram valores, respectivamente, de 99,5 e 86,5 g kg⁻¹. Queiroz *et al.* (2015) encontraram valor médio de 90,5 g kg⁻¹.

A variação de lipídeos encontrada no gérmen das amostras foi de 60,30 a 94,40 g kg⁻¹, os valores encontrados na literatura foram resultantes da avaliação do grão inteiro. Para Henz *et al.* (2013), a variação foi de 43,10 a 59,90 g kg⁻¹, para Carvalho *et al.* (2004), o valor encontrado foi 50,70 g kg⁻¹ e Gonçalves *et al.* (2003) apresentaram 53,10 g kg⁻¹. Para Tang *et al.* (2013), os valores encontrados variaram de 53,3 e 56,2 g kg⁻¹.

Na composição referente à fibra bruta, os valores encontrados para as amostras de milho crioulo variaram de 6,70 a 13,20 g kg⁻¹ esses valores concordam com os referenciados, sendo de 6,6 e 6,7 g kg⁻¹. (TANG *et al.*, 2013) e 13,10 g kg⁻¹ (D'AGOSTINI *et al.*, 2004). Outros autores encontraram valores superiores, de 16,30 g kg⁻¹ (VIEIRA *et al.*, 2007) e 16,02 g kg⁻¹ (AGUSTINI *et al.*, 2015). As fibras presentes nos grãos de milho são importantes na alimentação animal e na digestão ruminal e em sua composição estão presentes a celulose, hemicelulose, lignina e pectina, podendo haver variação em seus constituintes (PAES, 2006).

Tabela 9 – Caracterização físico-química dos cultivares quanto aos teores de amido, açúcar redutor total e amilose total dos cultivares de milho crioulo

	Amido (g kg ⁻¹)	Açúcar Redutor (g kg ⁻¹)	Amilose Total (g kg ⁻¹)
Amarelão	589,17 ± 0,51	3,67 ± 0,02	295,78±0,52
Caiano	576,30 ± 0,5	5,20 ± 0,05	342,69 ±1,04
Cunha	638,70 ± 0,02	6,30 ± 0,03	316,63±1,56
Rajado	630,00 ± 0,40	12,30 ± 0,00	321,84±0,00
Branco/Palmeira	751,40 ± 0,80	13,20 ± 0,03	295,78±0,52
Carioca	674,00 ± 0,30	13,30 ± 0,02	281,89±0,52
Palha Roxa	694,40 ± 0,56	13,00 ± 0,02	266,25±0,52
Branco/Teixeira Soares	754,80 ± 0,01	15,50 ± 0,03	332,27±0,00
MÉDIA	663,60	10,31	306,64
MAIOR VALOR	754,80	15,50	342,69
MENOR VALOR	576,30	3,67	266,25
MEDIANA	656,35	12,65	306,21

Para o teor de amido nos cultivares de milho crioulo observou-se variação de 576,30 a 754,80 g kg⁻¹, sendo que os cultivares Amarelão e Caiano apresentaram valores abaixo de 600 g kg⁻¹. Os valores estão coerentes com os referenciados. Em estudo com híbridos, os valores encontrados foram 703,1 e 714,6 g kg⁻¹ (TANG *et al.*, 2013). Em vinte cultivares de milho crioulo a média encontrada foi de 605,40 g kg⁻¹ (PINTO, 2009). Agustini *et al.* (2015) e Gonçalves *et al.* (2003) encontraram valor médio de 669,04 g kg⁻¹ e variação de 706,90 a 745,40 g kg⁻¹, respectivamente.

Os cultivares de milhos Branco (Palmeira e de Teixeira Soares) apresentaram os melhores resultados para o teor de amido, e o Caiano para o teor de lipídeos presente no gérmen. Em relação ao teor de proteína o cultivar de milho Branco (Palmeira) foi o cultivar mais favorável, apresentando o melhor resultado entre as amostras. Devido às diferenças encontradas de composição, às diversidades de utilização, de acordo com a finalidade dos mesmos, esses cultivares merecem mais estudos agronômicos.

Os açúcares redutores nos cultivares variaram entre 3,67 a 15,50 g kg⁻¹, indicando indiretamente o quanto o amido possui de açúcares na fração redutora.

Para os resultados do teor de amilose total, houve variação nos cultivares de 266,25 a 342,69 g kg⁻¹, sendo que o cultivar Palha Roxa apresentou valor de 266,25 g kg⁻¹ e o Caiano valor de 342,69 g kg⁻¹, com média entre os cultivares de 306,64 g kg⁻¹. Esses valores são similares aos encontrados na literatura. Em amostra de amido de milho comercial, o teor encontrado para a amilose foi 311,99 g kg⁻¹ (MYAT; RYU, 2014). Para Pinto (2009), o teor de amilose médio encontrado em vinte cultivares de milho crioulo foi 255,90 g kg⁻¹. A amilose é responsável pela cristalinidade do amido, pois suas moléculas ocupam maior volume quando

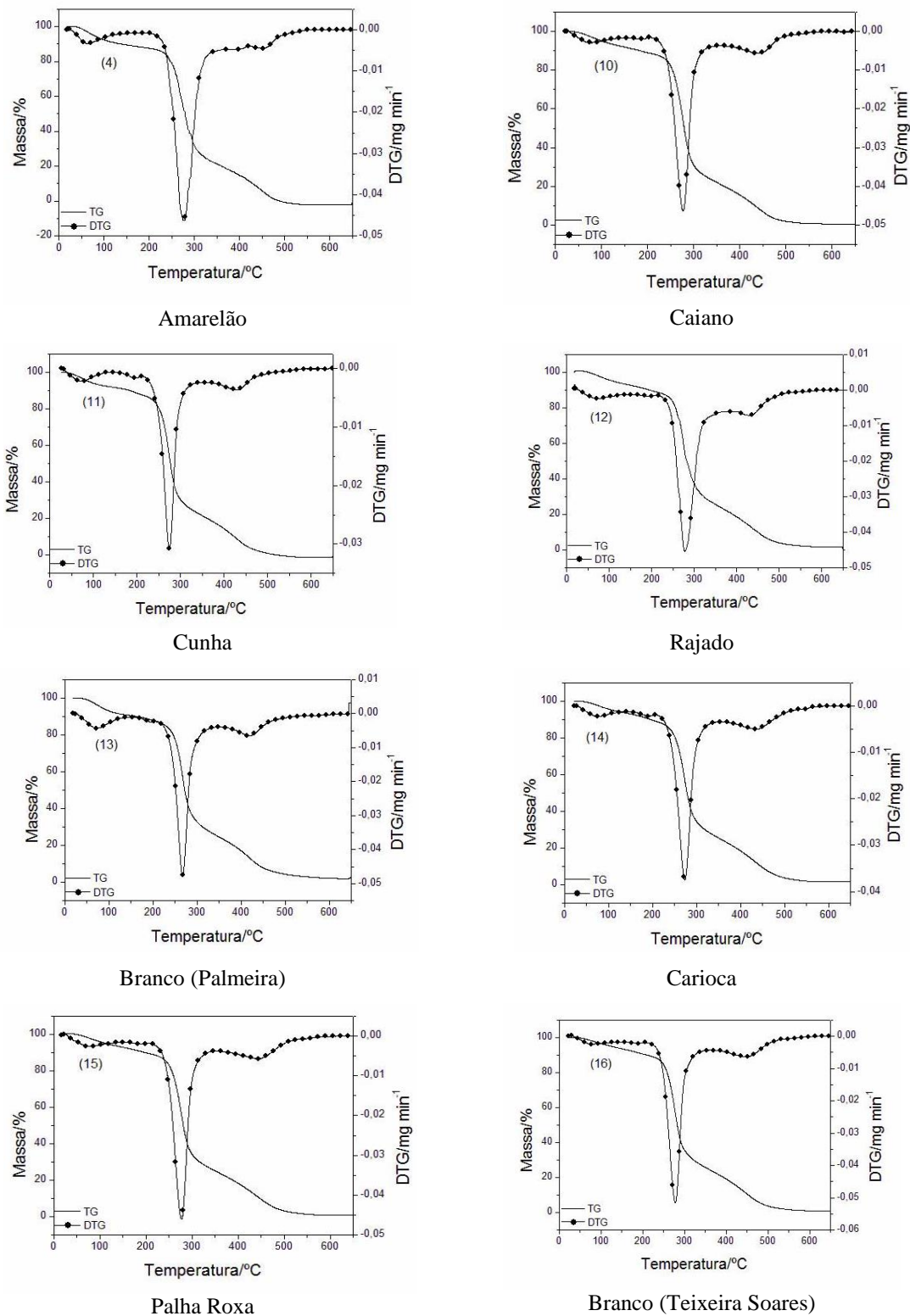
hidratadas. Por isso, amidos com maiores taxas de amilose absorvem água com facilidade, incham mais e suas soluções são mais viscosas, formando géis mais rígidos (REGULY, 1996).

5.2.1 Avaliação térmica dos cultivares de milho crioulo

A termogravimetria, TG-DTG, indica o comportamento de determinada massa quando submetida a processos térmicos, tais como: evaporação da água, perda de massa, estabilidade térmica e formação de resíduos após o processo de queima total. No caso das amostras de milho crioulos, os resultados estão apresentados na Figura 7.

Modificações e degradações são causadas quando os grânulos de amido são submetidos ao processo térmico. Essas alterações são devido à temperatura e tempo do evento, podendo resultar em perda completa de hidrato de carbono e ocorre a despolimerização, tornando essas alterações irreversíveis. (AGGARWALL; DOLLIMORE, 1998).

Figura 7 – Curvas termogravimétricas por TG/DTG nas amostras dos cultivares de milho crioulo



Na Tabela 10, encontram-se os valores de perda de massa nas diferentes etapas, bem como temperatura correlata. A 1^a etapa que ocorre entre os intervalos das temperaturas de 30 e

próximas de 180 °C corresponde a perda total de água (água de superfície e composição da matéria-prima) e perda de compostos voláteis.

A variação de água nas amostras foi de 6,99% para o milho Palha Roxa e 10,01% para o milho Amarelão, referentes à perda de massa de água contida nos milhos.

A segunda etapa (S) observada pelo intervalo de temperatura entre 180 °C a 206 °C ocorre a estabilidade térmica, evento no qual a matéria prima não sofre alteração composicional. Nas terceira e quarta etapas (2° e 3° na Tabela 10) ocorrem a degradação da matéria orgânica, inclusive da amilose e da amilopectina, das fibras e a formação de resíduo (cinzas).

Tabela 10 – Resultados termogravimétricos por TG/DTG dos cultivares de milho crioulo

Amostra	TG Resultados		DTG Resultados	
	Etapas	$\Delta m/\%$	$\Delta T/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$
Amarelão	1 ^a	10,11	30-164	62,35
	S	-	164-197	-
	2 ^a	69,04	197-369	276,32
	3 ^a	20,01	369-544	385,25
Caiano	1 ^a	8,05	30-150	74,68
	S	-	150-198	-
	2 ^a	71,03	198-358	277
	3 ^a	20,32	358-552	441,12
Cunha	1 ^a	8,03	30-145	72,49
	S	-	145-196	-
	2 ^a	70,04	196-348	274,58
	3 ^a	21,21	348-563	427,38
Rajado	1 ^a	7,43	30-147	72,93
	S	-	147-206	-
	2 ^a	70,91	206-374	277,58
	3 ^a	20,36	374-564	430,65
Branco (Palmeira)	1 ^a	9,88	30-152	72,73
	S	-	152-195	-
	2 ^a	66,65	195-353	267,14
	3 ^a	21,95	353-551	418,27
Carioca	1 ^a	7,62	30-161	74,62
	S	-	161-194	-
	2 ^a	68,64	194-362	273,07
	3 ^a	22,21	362-558	434,22
Palha Roxa	1 ^a	6,99	30-145	77,68
	S	-	145-200	-
	2 ^a	68,87	200-357	276,76
	3 ^a	23,01	357-561	440,96
Branco (Teixeira Soares)	1 ^a	7,05	30-162	79,12
	S	-	162-199	-
	2 ^a	68,69	199-364	277,9
	3 ^a	22,7	364-570	449,7

Os valores encontrados para teor de resíduo na análise térmica podem ser relacionados aos valores encontrados de cinzas na análise físico-química. (AGGARWALL; DOLLIMORE, 1998). Os valores para os resíduos foram de 1,52% para o Branco (Palmeira), 1,53% para o

Carioca e 1,56% para o Branco (Teixeira Soares). Em estudo com amido de milho comercial, a avaliação do início da perda composicional da matéria foi a uma temperatura de 245 °C, diferente da encontrada neste estudo em torno de 206°C (MAITI *et al.*, 2010).

5.2.2 Avaliação microscópica dos grânulos dos cultivares de milho crioulo por (MEV-FEG) com detecção elementar por EDS

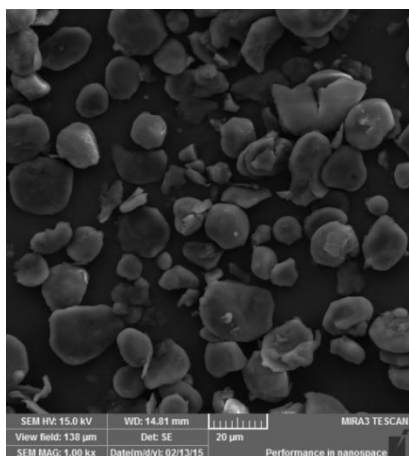
As micrografias dos grânulos de amido presente no endosperma da matéria-prima dos milhos crioulos visualizadas por avaliação microscópica por MEV-FEG podem ser observadas na Figura 8 (aumento de 1000x). A partir da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG) foi possível observar grânulos não homogêneos com formatos arredondados (Figura 8).

Singh *et al.* (2003) encontraram valor de diâmetro médio de grânulos de amido de 15 µm, com regiões cristalinas e amorfas. O mesmo valor foi encontrado Guinese *et al.* (2006) para diferentes amidos.

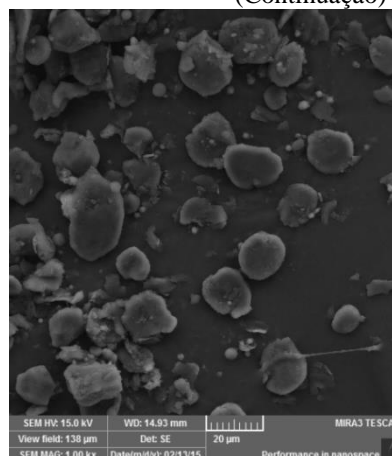
Segundo Ali *et al.* (2016), superfícies de diferentes fontes botânicas possuem variações na textura e formatos. Isso parametriza o ataque enzimático, visto que as formas esféricas dos grânulos resistem mais ao ataque em relação aos grânulos de forma poliédrica.

Figura 8 – Micrografias obtidas pelo MEV- FEG dos grânulos de amido presente nas estruturas das amostras sem sofrer processo de hidrólise

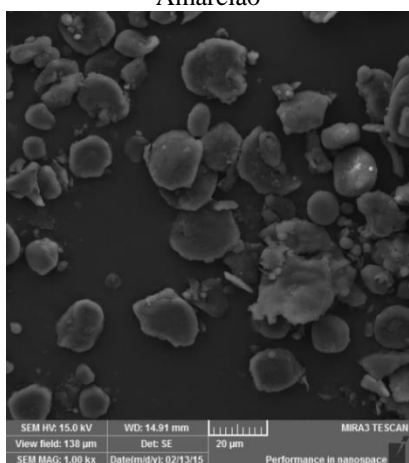
(Continuação)



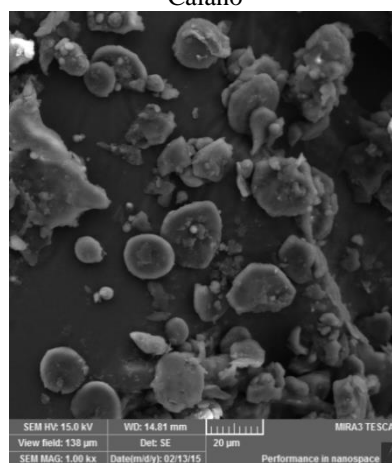
Amarelão



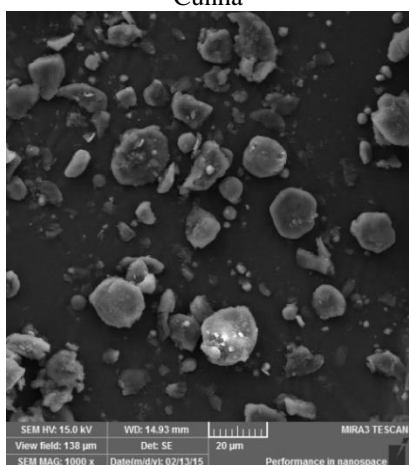
Caiano



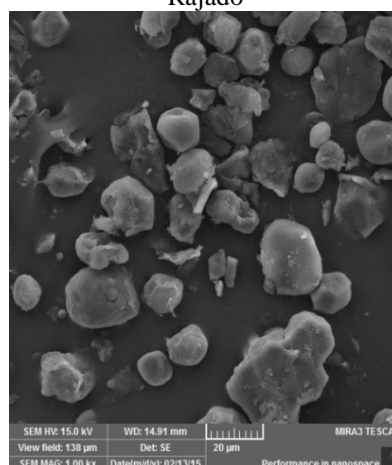
Cunha



Rajado

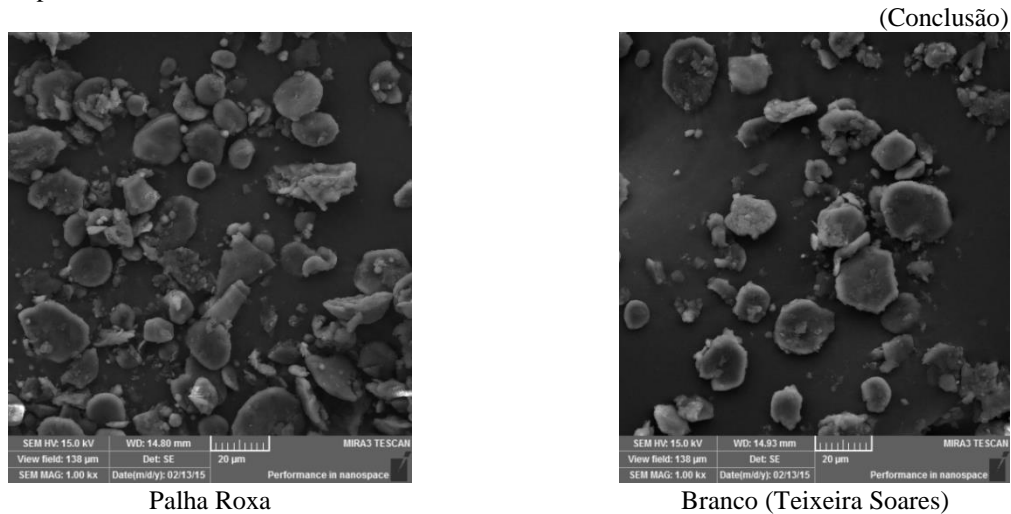


Branco (Palmeira)



Carioca

FIGURA 8 - Micrografias obtidas pelo MEV- FEG dos grânulos de amido presente nas estruturas das amostras sem sofrer processo de hidrólise.



Na Tabela 11, estão apresentados os resultados obtidos por meio da técnica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva dos grânulos no endosperma dos milhos crioulos estudados neste trabalho. Essa técnica permite analisar de forma semiquantitativa a composição elementar do material em estudo.

O carbono apresentou variação entre 76,09 e 78,84%. Para o elemento oxigênio, o cultivar Cunha apresentou 19,73% e os cultivares Palha Roxa e Rajado apresentaram as maiores médias 22,56 e 22,85%, respectivamente. Os valores para o cloro foram semelhantes entre os cultivares com uma variação entre 0,14 a 0,28%, já para o potássio as amostras Palha Roxa e Cunha apresentaram valores superiores a 1%, a amostra Amarelão apresentou quantidade igual a 0,20%.

Tabela 11 – Composição elementar dos elementos químicos presentes nos cultivares avaliados

	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Cloro (%)	Potássio (%)	Magnésio (%)	Fósforo (%)
Amarelão	78,30	21,40	0,14	0,20	-	-
Caiano	78,84	20,51	0,21	0,46	-	-
Cunha	77,84	19,73	0,19	1,60	0,60	1,06
Rajado	76,10	22,85	0,23	0,82	-	-
Branco (Palmeira)	78,51	20,98	0,16	0,38	0,13	0,02
Carioca	78,52	20,80	0,18	0,49	-	-
Palha Roxa	76,09	22,56	0,28	1,03	0,13	-
Branco (Teixeira Soares)	77,78	21,20	0,23	0,70	0,18	0,17

Nota: (*) Os valores são referentes às médias encontradas pelos pontos dos espectros nos grânulos no endosperma dos milhos crioulos.

Alguns cultivares Cunha, Branco (Palmeira) e Branco (Teixeira Soares), apresentaram quantidades de magnésio e fósforo em sua composição, o Palha Roxa apresentou somente magnésio.

Os valores encontrados para o potássio, magnésio e fósforo podem estar associados à forma de adubação dos cultivares durante o plantio e também à composição do próprio grão. Segundo Paes (2006), os principais minerais encontrados no grão de milho são o potássio, magnésio, cloro e sódio.

5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS MILHOS

Os micro-organismos responsáveis pela fermentação não possuem sistema enzimático que cinde o amido (devido à constituição macromolecular), condição necessária para o seu aproveitamento. Por esse motivo, o processo de hidrólise é necessário para a transformação de amido em glicose (REGULY, 1996).

Os resultados obtidos ao final do processo de hidrólise do amido estão na Tabela 12, sendo os valores de teor de açúcar avaliados por CLAE. Para quantidade de amido na solução antes da hidrólise, considerou-se a utilização de 50g de amostra como descrito no item 4.4. Esses valores encontrados para a quantidade de amido antes da hidrólise tiveram variação entre 288,15 g kg⁻¹ a 377,4 g kg⁻¹, sendo que os cultivares milho Branco (Palmeira) e milho Branco (Teixeira Soares) apresentaram valores superiores aos demais cultivares. Após o processo de hidrólise, o rendimento encontrado ao final do processo permaneceu no intervalo de 57,15 a 89,15%. Estes valores estão abaixo do rendimento da hidrólise, por meio de enzimas dextrinizantes (α -amilase) e sacarificantes (amiloglucosidase), o qual segundo Reguly (1996) deveria chegar a 96%. O cultivar milho Palha Roxa obteve o menor rendimento entre os cultivares com 57,15%. Um dos fatores que pode ter influenciado na hidrólise enzimática foi a granulometria diferentes entre os cultivares, pois em maior área superficial específica, há melhor contato com a enzima. (LERTPHANICH *et al.*, 2013).

Tabela 12 – Resultados do rendimento da hidrólise através da conversão do amido em glicose obtidos pela avaliação do processo de hidrólise

	Quantidade de amido na solução antes da hidrólise (g L ⁻¹)	Quantidade de glicose na solução após a hidrólise (g L ⁻¹)	Rendimento da hidrólise (g kg ⁻¹)
Amarelão	294,50± 0,00	238,40± 8,40	809,5
Caiano	288,15± 0,00	256,88± 1,32	891,5
Cunha	319,35± 0,00	229,23± 3,30	717,8
Rajado	315,00± 0,00	276,92± 3,45	879,1
Branco (Palmeira)	375,70± 0,00	296,24± 0,94	788,5
Carioca	337,00± 0,00	235,77± 1,77	699,6
Palha Roxa	347,20± 0,00	198,42± 1,62	571,5
Branco (Teixeira Soares)	377,40± 0,00	254,70± 0,90	674,9
MÉDIA	331,79	248,32	754,0

MENOR VALOR	288,15	198,42	571,5
MAIOR VALOR	377,4	296,24	891,5

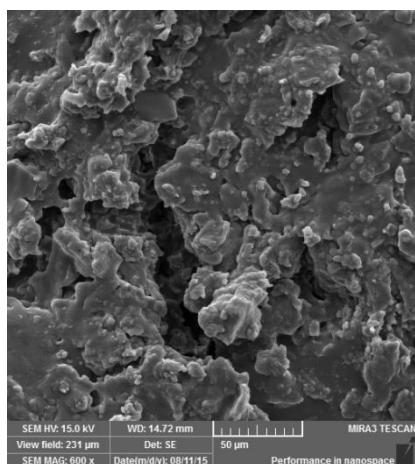
Por meio da análise das micrografias obtidas por MEV-FEG observaram que os tamanhos de grânulos não eram homogêneos, com uma distribuição larga de tamanho de partículas (Figura 8). Esse é um dos fatores que influenciam na área superficial específica. A alta porcentagem de finos, presente no processo faz com que a gelatinização e liquefação ocorra de forma mais rápida do que as partículas mais grossas, podendo haver reversão dos açúcares por sobreaquecimento, acarretando menor rendimento na hidrólise. (REGULY, 1996). Dentre os diversos responsáveis pela ação enzimática estão a concentração enzimática, o tempo e a temperatura, a espécie botânica do substrato, os quais podem facilitar ou limitar a hidrólise (REGULY, 1998).

Esses resultados indicam que o processo deve ser otimizado, como maior controle granulométrico e avaliação da atividade enzimática e pelo armazenamento prolongado (NOVOZYMES, 2015).

5.3.1 Aspectos Morfológicos dos cultivares após a hidrólise

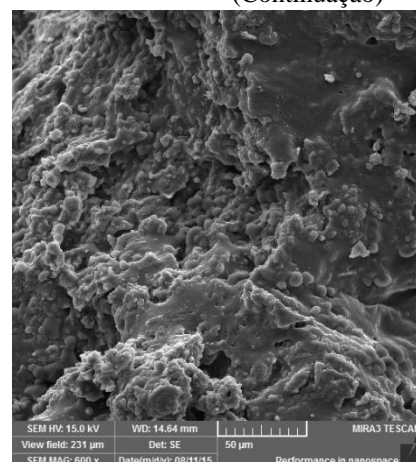
Por meio da análise das micrografias das amostras hidrolisadas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – FEG), pode-se caracterizar o efeito da hidrólise nos grânulos dos cultivares de milho crioulo (Figura 9).

Figura 9 – Micrografias dos grânulos após o processo de hidrólise nos cultivares de milho crioulo



Amarelão

(Continuação)

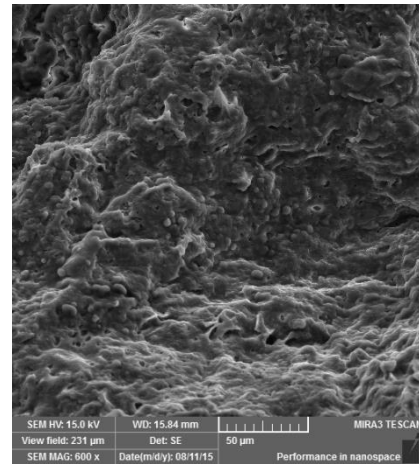


Caiano

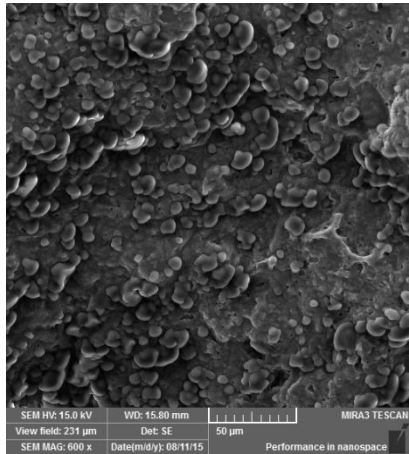
(Conclusão)



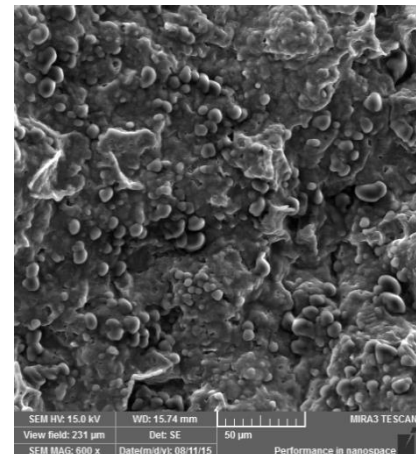
Cunha



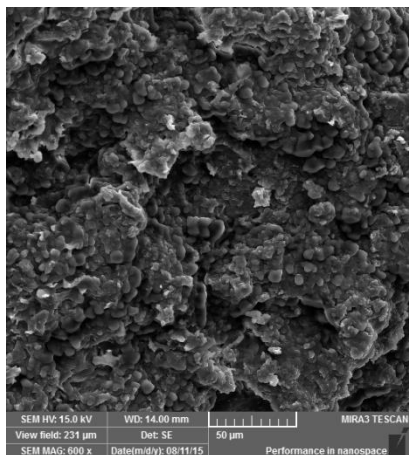
Rajado



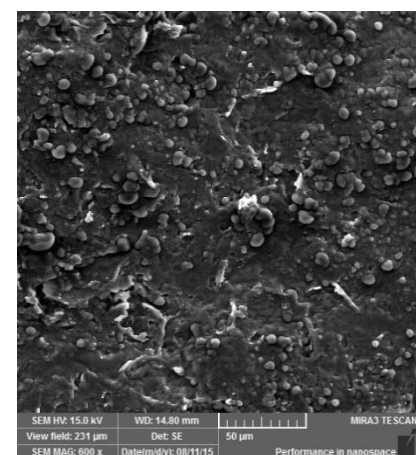
Branco (Palmeira)



Carioca



Palha Roxa



Branco (Teixeira Soares)

Os grânulos dos cultivares antes do processo de hidrólise (Figura 8) apresentam formato arredondado e sem qualquer sinal de corrosão ou gelatinização. Os grânulos submetidos à hidrólise (Figura 9) foram corroídos indicando ação das enzimas pelo processo de deterioração

dos grânulos (processo irreversível). Os grânulos intactos não sofrem gelatinização completa (REGULY, 1996).

5.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Os valores descritos na Tabela 13 indicam os valores de pH do mosto hidrolisado, °Brix inicial, volume de mosto final antes do processo fermentativo e a concentração de levedura após a diluição.

Observa-se na Tabela 13 que o pH no hidrolisado variou entre 4,62 a 4,88. Essa faixa está entre os valores referenciados, caracterizando o processo como normal. Para Reguly (1996), a faixa de pH ótimo está entre 4,7 e 5,4 para α -amilase e 4,0 e 5,0 para amiloglicosidase.

Devido à variação nos teores de açúcares iniciais (°Brix, Tabela 11) as amostras foram diluídas em água para o mosto alcançar 180 g L⁻¹ (°Brix), a fim de evitar impacto negativo sobre a levedura utilizada. Com mostos de concentrações de açúcares maiores, geralmente, ocorre fermentação incompleta, o que pode ocasionar perda de açúcares. Portanto, recomenda-se trabalhar com mostos entre 14 a 18 °Brix (140 g de glicose L⁻¹ a 180 g de glicose L⁻¹). (REGULY, 1998). Segundo Reguly (1996), cepas selecionadas de leveduras podem ser levadas a fermentar mostos com até 220 g L⁻¹ de glicose. Outro fator deve-se que foram colocadas diferentes concentrações de levedura de 0,0020 g mL⁻¹ a 0,0025 g mL⁻¹.

Tabela 13 – Avaliação do mosto hidrolisado das amostras para o processo fermentativo

	pH	°Brix inicial (g L ⁻¹)	Volume inicial para fermentação (mL)	Concentração de levedura inicial no mosto (g mL ⁻¹)
Amarelão	4,62± 0,05	190 ± 0,00	211,11	0,0024
Caiano	4,71± 0,02	190 ± 0,00	211,11	0,0024
Cunha	4,81± 0,01	190 ± 0,00	211,11	0,0024
Rajado	4,83± 0,01	210 ± 0,00	233,33	0,0021
Branco (Palmeira)	4,88± 0,00	220 ± 0,00	244,44	0,0020
Carioca	4,75± 0,01	190 ± 0,00	211,11	0,0024
Palha Roxa	4,74± 0,01	180 ± 0,00	200,00	0,0025
Branco (Teixeira Soares)	4,80± 0,01	200 ± 0,00	222,22	0,0023
MÉDIA	4,77	196,20	218,06	0,0023
MENOR VALOR	4,88	180	200,00	0,0020
MAIOR VALOR	4,62	220	244,44	0,0025

Na Tabela 14, encontram-se os resultados obtidos após 36 horas de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores encontrados para o etanol e açúcar residual foram determinados por cromatografia (CLAE), e os parâmetros analisados utilizaram-se as seguintes

variáveis: quantidade de substrato transformado ou utilizado pela levedura, quantidade de produto formado em função do tempo de fermentação e a porcentagem de conversão de glicose em etanol.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 14) nota-se que após o processo fermentativo dos cultivares: Amarelão e o Branco (Palmeira), somente esses apresentaram valores maiores que 1 g L^{-1} para teores residuais de açúcar ($4,376$ e $2,285 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente). Esses teores correspondem ao açúcar não consumido pela levedura durante o processo.

Os valores encontrados para o etanol após o processo variaram de $66,73$ a $90,08 \text{ g L}^{-1}$, provavelmente, correlacionado aos diferentes teores de açúcares após o processo de hidrólise.

O processo fermentativo deve estar relacionado com a concentração de substrato (glicose) fermentescível contido na solução pela concentração de leveduras utilizadas durante o processo. Portanto, considera-se que em função da quantidade de glicose produzida, a levedura não promoveu a conversão total em etanol.

Na prática industrial, o rendimento da fermentação alcoólica pode atingir 92% do rendimento estequiométrico, havendo consumo de açúcar para formação de biomassa celular e subprodutos. No experimento, apenas o cultivar Palha Roxa aproximou-se desse patamar com 84% (REGULY, 1996).

Os diferentes valores de rendimento fermentativo, ilustrados na Tabela 14, provavelmente, devem-se a vários fatores como: diluição dos açúcares fermentescíveis, aeração do mosto no início da fermentação, contaminação bacteriana e armazenamento da levedura. Os rendimentos obtidos podem estar associados também à inibição pelo substrato, que pode ocorrer pela a fermentação alcoólica com concentrações de glicose acima de 200 g L^{-1} .

Pode-se observar, ainda, que a maior produtividade de etanol não ocorreu para a maior concentração de substrato presente no meio. O maior valor de rendimento ocorreu para o menor nível de concentração celular no inóculo e maior concentração de levedura presente no meio.

A qualidade e o rendimento do produto dependem do controle de uma série de etapas, desde a obtenção da matéria-prima até o produto obtido, portanto, não havendo, necessariamente, correlação linear com a quantidade de amido inicial.

Tabela 14 – Parâmetros avaliados no mosto antes e após a fermentação alcoólica utilizando diferentes cultivares de milho crioulo

	Parâmetro inicial	Parâmetro final da fermentação	Parâmetros resultantes da fermentação							
	AF_0 (g L ⁻¹)	AF (g L ⁻¹)	X (g matéria-seca L ⁻¹)	S (g L ⁻¹)	$Y_{\frac{X}{S}}$ (g L ⁻¹)	P (g L ⁻¹)	$Y_{\frac{P}{S}}$ (g L ⁻¹)	PR (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Nb (g kg ⁻¹)	Np (g kg ⁻¹)
Amarelão	238,40± 8,40	4,736	11,52	233,66	0,05	76,35	0,33	2,12	639,4	626,7
Caiano	256,88± 1,32	0,787	13,37	256,09	0,05	66,73	0,26	1,85	509,9	508,4
Cunha	229,23± 3,30	0,023	12,43	229,21	0,05	72,31	0,32	2,01	617,4	617,3
Rajado	276,92± 3,45	0,931	15,76	275,99	0,06	80,43	0,29	2,23	570,3	568,4
Branco (Palmeira)	296,24± 0,94	2,285	12,72	293,96	0,04	83,22	0,28	2,31	554,0	549,7
Carioca	235,77± 1,77	0,110	13,09	235,66	0,06	85,30	0,36	2,37	708,3	708,0
Palha Roxa	198,42± 1,62	0,254	11,92	198,17	0,06	85,72	0,43	2,38	846,5	845,4
Branco (Teixeira Soares)	254,70± 0,90	0,000	13,17	254,70	0,05	90,08	0,35	2,50	692,1	692,0

Nota 1: AF_0 -Açúcares fermentescíveis inicial; AF -Açúcares fermentescíveis finais; X -Concentração celular produzida; S -Açúcar consumido; $Y_{\frac{X}{S}}$ - Conversão de substrato em biomassa; P - Etanol produzido; $Y_{\frac{P}{S}}$ - Conversão de substrato em etanol; PR - Produtividade de etanol; Nb (%)- Eficiência da fermentação com base no rendimento teórico; Np (%) Eficiência do processo com base na concentração inicial de açúcar;

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das avaliações pelos processos (agronômicos, químicos e biológicos) e caracterizações realizadas, foram obtidos diferentes quantitativos conforme os cultivares estudados como se pode observar nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Resultados quantitativos em massa a partir dos processos de obtenção de etanol em cultivares de milho crioulo

Cultivar	Amido g kg ⁻¹ milho	Glicose g kg ⁻¹ amido	Etanol g kg ⁻¹ glicose	Etanol L Mg ⁻¹
Amarelão	589,2	809,5	626,7	378
Caiano	576,3	891,5	508,4	331
Cunha	638,7	717,8	617,3	359
Rajado	630,0	879,1	568,4	399
Branco/Palmeira	751,4	788,5	549,7	413
Carioca	674,0	699,6	708,0	423
Palha Roxa	694,4	571,8	845,4	425
Branco/Teixeira Soares	754,8	674,9	692,1	447

Tabela 16 – Resultados quantitativos por hectare (ha⁻¹) a partir dos processos de obtenção de etanol em cultivares de milho crioulo

Cultivar	Produtividade kg ha ⁻¹	Amido kg ha ⁻¹	Glicose kg ha ⁻¹	Etanol kg ha ⁻¹
Amarelão	6307	3716	3008	1885
Caiano	2807	1671	1489	757
Cunha	2992	1911	1372	847
Rajado	3725	2347	2063	1173
Branco/Palmeira	4686	3521	2776	1526
Carioca	4835	3259	2280	1614
Palha Roxa	2611	1813	1036	876
Branco/Teixeira Soares	4113	3104	2095	1450

Alguns resultados merecem destaque. A produtividade do cultivar Amarelão, pelo nível de investimento econômico e tecnológico pode ser considerada expressiva. Os quantitativos elevados relativos ao amido, os cultivares denominados Brancos merecem mais estudos, com vistas a melhoramentos genéticos nesse parâmetro.

Todos os produtores utilizavam baixo nível econômico e tecnológico nos processos produtivos. As sementes utilizadas na semeadura são sementes adaptadas edafoclimaticamente.

Apenas um dos agricultores utilizou manejo orgânico e realizou cultura de inverno com cultura para cobertura (centeio) e cultura para fixação de nitrogênio (ervilhaca).

O valor relativo de glicose alcançado pelo cultivar Caiano mostra uma boa adaptação da enzima a este tipo de cultivar. O mesmo comentário pode ser traçado para o Palha Roxa para o processo de fermentação. Com relação à obtenção de etanol, ou à conversão milho-etanol,

destacam-se os cultivares Brancos, Caiano e Palha Roxa, cujos valores são superiores aos 400 L Mg^{-1} , valor adotado como o padrão de conversão quando há comparação do milho com outras culturas.

7 CONCLUSÕES

O cultivar Palha Roxa apresentou baixa produtividade (2611 kg ha^{-1}), pois segundo o produtor a semeadura foi realizada tarde (20/11/2013) e afetado por um período climático não favorável para a cultura. Porém, o cultivar Amarelão apresentou produtividade elevada para esse tipo sistema e investimento, com 6307 kg ha^{-1} .

O valor relativo de amido variou de $576,3$ a $751,4 \text{ g kg}^{-1}$. Dentre oito cultivares estudados, Branco de Teixeira Soares e Branco de Palmeira, apresentaram valores relativos elevados de amido, de $754,8$ e $751,4 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente.

Para a glicose transformada do amido, houve variação de $571,8$ a $891,5 \text{ g kg}^{-1}$ de amido com destaque para os cultivares Amarelão, Caiano e Rajado.

Na obtenção de etanol, no processo fermentativo, houve variação de $508,4$ a $845,4 \text{ g kg}^{-1}$ de glicose com destaque para o cultivar Palha Roxa.

Na avaliação térmica, pode-se destacar que o cultivar Rajado apresentou maior intervalo de temperatura de estabilidade entre as amostras.

Como conversão final ou como cultivares crioulas potenciais para o processo de obtenção de etanol, destacaram-se os milhos Brancos, Carioca e Palha Roxa com valores de etanol superiores a 400 Mg^{-1} de milho.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (ANP). **Resolução ANP nº 7, de 9.2.2011** - DOU 10.2.2011 – RETIFICADA DOU 14.4.2011 e Resolução ANP nº 7, DE 9.2.2011 – DOU 14.4.2014. Disponível em: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/fevereiro/ranp%207%20-%202011.xml. Acesso em: 14 ago. 2014.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica Acta**, v. 319, n. 1-2, p. 17-25, 1998.

AGUSTINI, M. A. B.; NUNES, R. V.; SILVA, Y. L.; VIEITES, F. M.; EYNG, C.; CALDERANO, A. A.; GOMES, P. C. Coeficiente de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis verdadeiros de diferentes cultivares de milho para aves. **Ciências Agrárias**, v. 36, n.2, p. 1091-1098, 2015.

ALI, A.; WANI, T. A.; WANI, I. A.; MASOODI, F. A. Comparative study of the physico-chemical properties of rice and corn starches grown in Indian temperate climate. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 1, p. 75-82, 2016.

ARAUJO, A. V.; BRANDAO JUNIOR, D. S.; FERREIRA, I. C. P. V.; COSTA, C. A.; PORTO, B. B. A. Desempenho agrônomo de variedades crioulas e híbridos de milho cultivados em diferentes sistemas de manejo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, 2013.

ARAUJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**: Agricultural chemicals, contaminants, drugs. AOAC International, 2000.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**, Ed. Edgard Blucher LTDA, v.5, 1993.

BARROS, T. D.; JARDINE, J.D. **Etanol de Milho**, Embrapa/DF, Brasília, 2009. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1n2lt02wyiv802hvm3jaej3vda.html>. Acesso em: 14 jan. 2014.

BATALHA, C. D. A. **Processamento de grãos de milho para vacas leiteiras em pastagem tropical**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

BONATO, D. V.; NEUMANN, M.; UENO, R. K.; JUNIOR, J. C. H.; HORST, E.H.; CARNEIRO, M. K.; POCZYNEK, M.; RUTHS, R.; FIGUEIRA, D. N.; TEIXEIRA, P. P. M.; Uso de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de bovinos. **Revista Investigação**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2015.

BRAKE, J.; FAUST, M.; STEIN, J.; Evaluation of transgenic hybrid corn (VIP3A) in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 84, n. 3, p. 503-512, 2005.

CATÃO, H. C. R. M.; COSTA, F. M.; VALADARES, S. V.; DOURADO, E. R.; JUNIOR, D. S. B.; SALES, N. L. P. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho crioulo produzidas no norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2060-2066, 2010.

CAMILI, E. A. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP, 2010.

CANHOTO, J. M. Cultura de plantas geneticamente modificadas: 20 anos e 170 milhões de hectares depois. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2014.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; CARVALHO, C. H.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E.; LOPES, M. A. Milho transgênico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 13, n. 15, 2000.

CARVALHO, D. C. O.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; OLIVEIRA, J. E.; VARGAS JUNIOR, J. G.; TOLEDO, R. S.; COSTA, C. H. R.; PINHEIRO, S. R. F.; SOUZA, R. M. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 2, p. 358-364, 2004.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527-1534. 2009.

CHAVES, M. C.; GOMES, C. F. S. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Production**, v. 24, n. 3, p. 495-507, 2014.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 200 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Monitoramento agrícola: Safra 2014/2015**, v. 2, 2015.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; QUEIROZ, L. R. **Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14**, EMBRAPA, 2014, Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares>. Acesso em: 14 ago. 2014.

D'AGOSTINI, P.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; SÁ, L. M. Valores de composição química e energética de alguns alimentos para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 128-134, 2004.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Enzymatic determination of starch in doce de leite using dialysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 339-342, 2001.

DEMIATE, I. M.; WOSIACK, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002.

DROCHIOIUA, G.; CIOBANUA, C. I.; BANCILAB, S.; IONB, L.; PETREA, B. A.; ANDRIE, B. C.; GRADINARUB, R. V.; MURARIUA, M. Ultrasound-based protein determination in maize seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 93-103, 2016.

EL-MANSI, E. M. T.; BRYCE, C. F. A.; DEMAIN, A. L.; ALLMAN, A. R. **Fermentation Microbiology and biotechnology**. v. 2, New York: Ed. Taylor e Francis, 2007.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D.; LUIZ, A. **Produção de Milho: Ecofisiologia e Fenologia**. Guaíba, RS: Ed. Agropecuária-LTDA, 2000. p. 21-22.

FARIAS, F.O. **Produção de Etanol de segunda geração a partir de soro de leite e água de maceração de milho**. 2015. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

FERES, P. F. D. **Os biocombustíveis na matriz energética alemã: Possibilidades de cooperação com o Brasil**, Brasília-DF: Ed. FUNAG, 2010. p. 65-88.

GALVAO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819-828, 2014.

GUINESI, L. S.; RÓZ, A. L.; CORRADINI, E.; MATTOSO, L. H. C.; TEIXEIRA, E. M.; CURVELO, A. A. S. Kinetics of thermal degradation applied to starches from different botanical origins by non-isothermal procedures. **Thermochimica Acta**, v. 447, n. 2, p. 190-196, 2006.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R.; ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de *grits*. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 27, n. 3, p. 643-650, 2003.

HENZ, J. R.; NUNES, R. V. POZZA, P. C.; FURLAN, A. C.; SCHERER, C.; EYNG, C.; SILVA, W. T. M. Valores energéticos de diferentes cultivares de milho para aves. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2403-2414, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1ª versão eletrônica. São Paulo, SP, 2008.

KLJAK, K.; GRBESA, D. Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids. **Food Chemistry**, v. 167, p. 402-408, 2015.

KWIATKOWSKI, J. R.; MCALOON, A. J.; TAYLOR, F.; JOHNSTON, D. B. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. **Industrial Crops and Products**, v. 23, n. 3, p. 288-296, 2006.

KOKUSZKA, R. **Avaliação do teor nutricional de feijão e milho cultivados em sistemas de produção convencional e agroecológico na região centro-sul do Paraná**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LEIVAS, C. L.; COSTA, F. J. O. G.; ALMEIDA, R. R.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S.C.; SCHINITZLER, E. Structural, physico-chemical, thermal and pasting properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) flour: Study of different cultivars and granulometries. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2211-2216, 2012.

LERTPHANICH, S.; WANSUKSRI, R.; TRAN, T.; DA, G.; NGA, L. H.; DUFOUR, D.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. Comparative study on physicochemical of en sete and water cal trop with other root, tuber and legume starches. **Starch-Stärke**, v. 65, n. 11-12, p. 1038-1050, 2013.

LOPES FILHO, J. F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subsequente quebra do pericarpo do grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, 1999.

LUCCHIN, M.; BARCACCIA, G.; PARRINI, P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* L. convar. *mays*) Italian landrace: I. Morpho-phenological and agronomic traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 315-327, 2003.

MAAREL VAN DER, M. J. E. C.; BART VAN DER, V.; UIDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

MAITI, M.; KAITH, B. S.; JINDAL, R.; JANA, A. K. Synthesis and characterization of corn starch based green composites reinforced with *Saccharum spontaneum* L graft copolymers prepared under micro-wave and their effect on thermal, physio-chemical and mechanical properties. **Polimer Degradation and Stability**, v. 95, n. 9, p. 1694-1703, 2010.

MENEGUETTI, G. A.; GIRARDI, J. L.; REGINATTO, J. C. Milho crioulo: tecnologia viável e sustentável. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 3, n. 1, p. 12-17, 2002.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. p.141-166.

MYAT, L.; RYU, G. H. Effect of thermostable α -amylase injection on mechanical and physiochemical properties for saccharification of extruded corn starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 288-295, 2014.

MOTHE, C. G.; DAMICO, A.; MACHADO, M. G. S. Estudo termo analítico CLAE e fracionamento físico e químico do subproduto industrial do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25 n. 1, p. 1-7, 2005.

NOVOZYMES, 2015. **Ficha de Informação do produto (enzimas)**. Disponível em: www.novozymes.com. Acesso em: 22 jul. 2015.

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417-436, 2010.

ORTIZ, S.; SIMIONATTO, E. L.; BARROS, A. A. C. Avaliação da capacidade fermentativa e do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174 S. *In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 2014, Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: CBEQ, 2014.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão do milho**. EMBRAPA, 2006. (Circular Técnica, 75). Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf. Acesso em: 14 jan. 2014.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G. Extraction of zein and its application in food preservation. **Revista Ciência Rural**, v. 45, n. 3, 2015.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento do milho. *In: BULL, L.T; CANTARELLA, H. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*, São Paulo: Potafos, Piracicaba, 1993. cap. 3, p. 23-43.

PINTO, A. T. B. **Caracterização de variedades de milho crioulo cultivadas nas regiões dos Campos Gerais para utilização agroindustrial**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

PIERAGOSTINI, C.; AGUIRRE, P.; MUSSATI, M. C. Life cycle assessment of corn-based ethanol production in Argentina. **Science of The Total Environment**, v. 472, p. 212-225, 2014.

QUEIROZ, A. P. L. B.; CARVALHO, C. M. C.; MARTINS, J. M. S.; LITZ, F. H.; FERNANDES, E.A. Composição bromatológica, energia metabolizável e digestibilidade de nitrogênio e extrato etéreo de amostras de milho e sorgo para frangos de corte em diferentes idades. **Veterinária Not.**, v. 21, n. 1, p. 30-40, 2015.

RASOVSKY, E.M. **Álcool: Destilarias**. Rio de Janeiro: Ed. Canavieira, 1973. n. 12, cap. 2, p. 23 e 303.

REGULY, J. C. **Biotechnology dos processos fermentativos**. Pelotas, RS: Ed. Universitária, 1996. v.1, cap. 1-8, p. 31-202.

_____. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas, RS: Ed. Universitária, 1998. v. 2, cap. 2, p. 25-103.

_____. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas, RS: Ed. Universitária, 2000. v. 3, cap. 6, p. 137-176.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). 2013. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Acesso em: 14 ago. 2014.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

RIBEIRO, E. P.; SERVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. São Paulo, SP: Ed. Blucher, 2007. v. 2, cap. 2, p. 58-68.

ROSAS-CASTOR, J. M. GUZMÁN-MAR, J. L.; RAMIREZ, A. H.; GARZA-GONZALEZ, M. T.; HINOJOSA-REYES, L. Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. **Science of The Total Environment**, v. 488-489, p. 176-187, 2014.

SANCHEZ, O.; CARDONA, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANDHU, K. S.; SINGH, N.; LIM, S-T. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1527-1536, 2007.

SANTOS, T. P. M. **Impacto do dióxido de enxofre na composição química e no perfil de voláteis de sidras varietais**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

SEMENCENKO, V. V.; MOJOVIĆ, L. V.; DUKIĆ-VUKOVIĆ, A. P.; RADOSAVLJEVIĆ, M. M.; TERZIĆ, D. R.; SEREMEŠIĆ, M. S. M. Suitability of some selected maize hybrids from Serbia for the production of bioethanol and dried distillers' grains with solubles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 811-818, 2013.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; GUERRA, C. A. A.; MACIAS, P. H.; CUELLAR, J. L. M.; ORTIZ, R. E. P.; IBARRA, A. D. T.; CARRILLO, G. V. Evaluation of the Lime-Cooking and Tortilla Making Properties of Quality Protein Maize Hybrids Grown in Mexico. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 119-125, 2008.

SILVA, D. J. **Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. v. 3, cap. 3, p. 47-51.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH SODHI, N.; SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília, DF: Ed. Embrapa, 1995.

SIQUEIRA, G. L. A.; BET, C. D.; CORDOBA, L. P.; LAZZAROTTO, M.; SCHNITZLER, E. Caracterização térmica de amido e bagaço de *Amaranthus cruentus*. In: VII SIMPÓSIO DE ANÁLISE TÉRMICA, 2015, Bauru, **Anais** [...]. Bauru, SP: SAT, 2015. p. 189-192.

SPIER, F.; ZAVAREZE, E. R.; MARQUES E SILVA, R.; ELIAS, M. C.; DIAS, A. R. G. Effect of alkali and oxidative treatments on the physicochemical, pasting, thermal and morphological properties of corn starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2331-2337, 2013.

SOBRINHO, P. **Processo (simplificado) de produção de etanol de milho - destilaria/usina flex - abordagem descritiva de um novo potencial**. Mato Grosso, MT: CONAB 2012.

TANG, M.; HE, X.; LUO, Y.; MA, L.; TANG, X.; HUANG, K. Nutritional assessment of transgenic lysine-rich maize compared with conventional quality protein maize. **Journal Science Food Agriculture**, v. 93, p. 1049-1054, 2013.

TEIXEIRA, M. A. V.; CIACCO, C. F.; TAVARES, D. O.; BONEZZI, A. N. Ocorrência e caracterização do amido resistente em amidos de milho e de banana. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 18, n. 2, 1998.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1327-1332, 2012.

NATIONAL NUTRIENT DATABASE FOR STANDARD REFERENCE (USDA).

Software. 2014. Disponível em:

<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6364?fg=Cereal+Grains+and+Pasta&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=0&sort=&qlookup>. Acesso em: 14 ago. 2014.

VIEIRA, R. O.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F; NASCIMENTO, G. A. J.; SILVA, E. L.; HESPANHOL, R. Composição química e energia metabolizável de híbridos de milho para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 832-838, 2007.

VOGT, S. P. C.; PANDOLFO, M. C.; BALLIVIÁN, J. M. P.; SOUZA, J. C. D. Estratégias para o resgate e conservação de variedades de milho crioulo e nativo: a experiência dos guardiões da agrobiodiversidade de Tenente Portela-RS. **Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 48-54, 2012.

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 169-176, 2010.

YANGCHENG, H.; JIANG, H.; BLANCO, M.; JANE, J-L. Characterization of Normal and Waxy Corn Starch for Bioethanol Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 379-386, 2013.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Physicochemical, rheological, morphological, and thermal characterization of normal, waxy, and high amylose corn starches. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

WEIRICH NETO, P. H. **Importância de atributos agronômicos para qualificação da semeadura do milho (*Zea mays*) no sistema plantio direto na região dos Campos Gerais – PR.** 2004. 158 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

WELL, J. H. **Bioquímica geral.** Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

WUTZKI-MODENA, R. M. **Densidade de plantas, componentes do rendimento e qualidade de sementes de variedades crioulas e comerciais de milho.** Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H.; REID, D. S.; SCHWARTZ, S. J.; SHOEMAKER, C. F.; MITH, D. M.; SPORNS, P. **Hanbook of food analytical chemistry – water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates.** New Jersey: Ed. Wiley-Interscience, 2005. v. 2, p. 671-689.