

CAROLINE THAÍS ECKERT

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE
DISTINTOS HÍBRIDOS DE MILHO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

CASCABEL
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2016

CAROLINE THAÍS ECKERT

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE
DISTINTOS HÍBRIDOS DE MILHO NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação de
Engenharia em Energia na Agricultura,
para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elisandro
Pires Frigo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Leandro
Paiola Albrecht

CASCADEL

PARANÁ - BRASIL

FEVEREIRO – 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E21a Eckert, Caroline Thaís
Avaliação da produção de etanol a partir de distintos híbridos de milho na região Oeste do Paraná./Caroline Thaís Eckert. Cascavel, 2016.
74 p.

Orientador: Prof. Dr. Elisandro Pires Frigo
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Paiola Albrecht

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2016
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia de Energia na
Agricultura

1.Biocombustíveis. 2. Zea mays. 3. Genótipos. I.Frigo, Elisandro Pires. II.
Albrecht, Leandro Paiola. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV.
Título.

CDD 22.ed. 662.669
CIP – NBR 12899

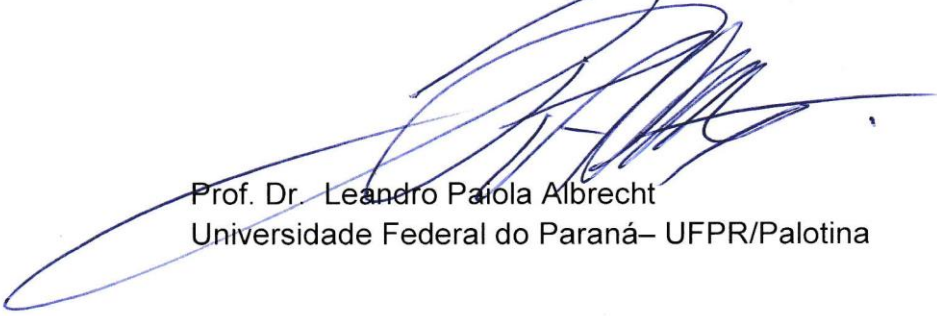
CAROLINE THAIS ECKERT


“Avaliação da produção de etanol a partir de distintos híbridos de milho na região Oeste do Paraná”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia de Energia na Agricultura em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Energia na Agricultura, área de concentração Agroenergia, **aprovada** pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:  Prof. Dr. Elisandro Pires Frigo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Cascavel

 Prof. Dr. Helton José Alves
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Cascavel

 Prof. Dr. Leandro Parola Albrecht
Universidade Federal do Paraná– UFPR/Palotina

 Prof. Dr. Laercio Augusto Pivetta
Universidade Federal do Paraná– UFPR/Palotina

Cascavel, 05 de fevereiro de 2016.

*À minha família, pelo suporte e inspiração a cada
passo dessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça desta história maravilhosa.

À minha família, pela abdicação de muitos confortos para destinar suporte a esta jornada.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Elisandro Pires Frigo, Prof. Dr. Leandro Paiola Albrecht, pelo auxílio, apoio e ensinamentos incalculáveis.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* de Engenharia em Energia na Agricultura, pelos ensinamentos transmitidos.

À Jacir Berri Junior, pelo incentivo interminável e amor incondicional.

Aos meus amigos e companheiros laboratoriais, Anderson Eduardo Grzesiuck, Lucas Dierings dos Santos, Bruno Cosmos, Paulo José Ferreira e Eduardo Fritz Berkembrock, assim como à Weslei Gomes e ao grupo de Pesquisa SUPRA pelo apoio nos campos experimentais.

À todos os amigos e amigas que demonstraram apoio e me deram fôlego para a conclusão dessa etapa.

À Secretaria da Coordenação de Pós-Graduação, em especial a Vanderléia Luzia Stockmann Schmidt e Keren Paula da Silva, pela amizade e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/DS pela bolsa de estudos que possibilitou dedicação integral a este trabalho.

Sinceramente, obrigada!

“Não existem métodos fáceis para resolver problemas difíceis.”

René Descartes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da amilopectina.....	10
Figura 2: Estrutura química da amilose.....	11
Figura 3: Conformação comum para alfa-amilases.....	12
Figura 4: Estrutura cristalina do domínio catalítico da enzima amiloglucoamilase obtida a partir de <i>A. niger</i>	13
Figura 5: Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos ou exógenos, conduzida por <i>Saccharomyces</i>	14
Figura 6: Processo de obtenção de etanol através de hidratação indireta do eteno.....	17
Figura 7: Processo de obtenção do etanol via hidratação direta do eteno.....	17
Figura 8: Processo de obtenção de etanol via fermentativa utilizando cana de açúcar.....	18
Figura 9: Dados meteorológicos das cidades de Palotina e Assis Chateaubriand.....	22
Figura 10: Teor de umidade para os híbridos de Palotina e Assis Chateaubriand.....	29
Figura 11: Produtividade de biomassa em Kg ha ⁻¹ , para Palotina e Assis Chateaubriand.....	30
Figura 12: Teor de amido para os híbridos de Palotina e Assis Chateaubriand.....	31
Figura 13: Teor de sólidos solúveis iniciais para os híbridos de Palotina e Assis Chateaubriand.....	32
Figura 14: Teor de sólidos solúveis finais para os híbridos de Palotina e Assis Chateaubriand.....	334
Figura 15: Porcentagem de etanol no mosto a partir das amostras de Palotina e Assis Chateaubriand.....	35
Figura 16: Estimativa de produtividade em litros de etanol ha ⁻¹ para os híbridos de Palotina e Assis Chateaubriand.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de algumas matérias-primas para o etanol.....	4
Tabela 2:Produtividade e rendimento de distintas matérias-primas amiláceas em comparação com a cana-de-açúcar.	6
Tabela 3: Exportações de milho (exceto para semeadura) de 2010 a 04/2015.....	7
Tabela 4: Oferta de milho no Brasil	7
Tabela 5: Composição média do milho.	8
Tabela 6: Empresas, eventos, marcas, toxinas e data de liberação de eventos transgênicos de milho <i>Bt</i> no Brasil.....	9
Tabela 7: Características químicas dos solos dos experimentos. Palotina e Assis Chateaubriand, PR, setembro de 2014.	23
Tabela 8: Híbridos cultivados em Palotina e Assis Chateaubriand	23

RESUMO

ECKERT, Caroline Thaís. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2016. **Avaliação da Produção de Etanol a partir de distintos Híbridos de Milho na Região Oeste do Paraná.** Prof. Dr. Elisandro Pires Frigo, Prof. Dr. Leandro Paiola Albrecht.

Com o objetivo de averiguar qual o melhor híbrido de milho para a produção de etanol, de acordo com características da região Oeste do estado do Paraná, foram avaliados 10 híbridos, sendo que 9 possuem tecnologia transgênica *Bt* e 1 convencional 'não-*Bt*'. O desenvolvimento experimental, a campo, foi realizado entre os meses de fevereiro a outubro de 2015, sendo utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, e o teste de média empregado foi o Teste de Tukey ($\leq 0,05$) juntamente com a Matriz de Correlação ($\leq 0,05$) e a Análise de Contraste ($\leq 0,05$). As análises laboratoriais realizadas foram de cunho de produtividade e rendimento (em kg ha⁻¹ e L etanol ha⁻¹), de conteúdo amiláceo, de sólidos solúveis e de percentual em etanol no mosto produzido. Os híbridos estiveram em conformidade com a literatura pelo fato de que a quantidade produzida de biomassa por hectare foi relevante para o rendimento em litros de etanol por hectare, da mesma forma que a qualidade dos grãos foi indispensável para que houvesse bom desempenho dos híbridos.

Palavras-chave: *Zea mays*, Genótipos, Biocombustíveis.

ABSTRACT

ECKERT, Caroline Thaís. State University of West Paraná, February 2016. **Assessment of Ethanol Production from different Hybrid Maize in the Western Region of Paraná.** Prof. Dr. Elisandro Pires Frigo, Prof. Dr. Leandro Paiola Albrecht.

With the aim of find out what the best hybrid maize for ethanol production, according to characteristics of the state of Paraná Western region were evaluated 10 hybrids, and 9 have transgenic technology *Bt* and 1 conventional 'non-*Bt*'. The experimental development, the field was conducted between February and October 2015, and used a randomized block with four replications, and the average test employee was Tukey test ($\leq 0,05$), along with Correlation Matrix ($\leq 0,05$) and Contrast Analysis ($\leq 0,05$). The laboratory tests were conducted productivity and yield of die (kg ha^{-1} and L ethanol ha^{-1}), the starch content, of soluble solids, and the percentage of ethanol in the wort produced. The hybrids were in accordance with literature by the fact that the amount of biomass produced per hectare was relevant to the yield of ethanol liters per hectare, in the same way that the quality of the grains had been indispensable for the good performance of hybrids.

Keywords: *Zea mays*, Genotypes, Biofuels.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Matérias-primas para produção de etanol	3
2.1.1. Sacaríneas	3
2.1.2. Ligninocelulósicos.....	4
2.1.3. Amiláceas	5
2.1.3.1. Milho (<i>Zea mays</i> L.)	6
2.1.3.1.1. O amido.....	10
2.2. Enzimas.....	11
2.2.1. Alfa-amilase.....	11
2.2.2. Amiloglucoamilase (glicoamilase)	13
2.3. Leveduras.....	13
2.4. Etanol.....	15
2.4.1. Fermentação alcoólica	15
2.4.2. Formas de Produção de etanol.....	16
2.4.3. Panorama	19
2.5. Etanol de milho	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Localização	22
3.2. Híbridos cultivados	23
3.3. Análises.....	24
3.3.1. Teor de umidade dos grãos de milho.....	24
3.3.2. Estimativa de produtividade por hectare	24
3.3.3. Teor de amido	25
3.4. Produção de etanol de milho.....	26
3.4.1. Hidrólise	26
3.4.2. Sacarificação.....	26
3.4.3. Teor de sólidos solúveis totais (TSST).....	26
3.4.4. Fermentação.....	27

3.4.5. Quantificação do teor de etanol no mosto	27
3.5. Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1. Teor de umidade dos grãos de milho	29
4.2. Estimativa de produtividade de grãos (Kg ha ⁻¹)	30
4.3. Teor de amido	31
4.4. Teor de sólidos solúveis iniciais	32
4.5. Teor de sólidos solúveis finais	33
4.6. Quantificação do teor de etanol no mosto	35
4.7. Estimativa de Produtividade em Etanol ha ⁻¹	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. AGRADECIMENTOS	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO 1	57
ANEXO 2	57
ANEXO 3	59

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis surgiram como uma alternativa apresentada para mitigar impactos ambientais, e para suprir novas demandas energéticas, diminuindo a importação e produção de combustíveis fósseis, além de, estimular o crescimento agrícola e proporcionar melhores condições econômicas ao meio agroenergético.

O entendimento adequado da matriz energética, requer conhecimento dos distintos recursos energéticos disponíveis, e que sejam passíveis de uso no cenário tecnológico atual. Para cada recurso natural, enfatiza-se os aspectos principais e as características que estão relacionadas com a indústria de energia, adequando e adaptando o recurso para melhor uso no setor energético (REIS et al., 2005).

Ao analisar aspectos mercadológicos, nota-se que na última década, a quantidade de biocombustíveis produzida no mundo aumentou em cinco vezes, sendo os maiores detentores desse patamar países como: Estados Unidos, Brasil e da União Europeia (CONDON et al., 2015).

O aprimoramento e estudo de matérias-primas para a produção de etanol é essencial para a consolidação desse biocombustível na matriz energética mundial. De tal forma que os principais insumos para a produção são de origem sacarínea e amilácea. A obtenção de etanol a partir de culturas amiláceas é pouco difundida no Brasil, no entanto, os Estados Unidos se destaca pela fermentação do milho, tendo mais de 90% da sua produção de etanol advinda desse insumo.

O milho possui características produtivas favoráveis, tendo alto rendimento por área plantada, ademais, sua colheita é totalmente mecanizada, e a tecnologia de produção e pós colheita já é consolidada no Brasil. Apenas aspectos industriais referentes a geração de etanol encarecem o produto final, de maneira que, caso haja a introdução da indústria de etanol amiláceo, outras fontes amiláceas poderão ser utilizadas, tornando o processamento não restritivo.

A obtenção do etanol de milho é dependente de fatores como a hidrólise, utilizando ácidos ou enzimas, que convertem o amido disponível no grão, em açúcares simples, sendo então sacarificada, e, posteriormente fermentada, utilizando de leveduras. A hidrólise enzimática possui alta eficiência, em razão de que as enzimas apresentam grande especificidade em romper ligações dos componentes majoritários do amido.

As produções científicas brasileiras referentes ao etanol de milho basicamente se detêm em comparações mercadológicas e de consumo líquido de energia entre o milho e diversas matérias-primas, não se atendo a capacidade de geração de etanol. Além de que, a implementação do milho na cadeia produtiva do etanol brasileiro suprirá a demanda por matérias-primas causada na entressafra da cana-de-açúcar (90 a 120 dias).

O objetivo do presente trabalho foi averiguar as distinções entre os híbridos de milho quanto ao seu rendimento agrônômico, e o seu potencial agroenergético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Matérias-primas para produção de etanol

Qualquer material que contenha açúcar ou outro carboidrato pode ser considerado insumo para a produção de etanol (LIMA et al., 2001).

2.1.1. Sacaríneas

As matérias-primas sacaríneas agrupam cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas (LIMA et al., 2001).

De todas as opções disponíveis, o etanol de cana-de-açúcar alcançou alta comercialidade, sendo que possui um balanço energético positivo, e tem sido beneficiado por políticas governamentais em alguns países, incluindo o Brasil, que abastece aproximadamente 40% dos veículos leves com o combustível (GOLDEMBERG, 2009).

De acordo com Lima et al. (2001) a cana-de-açúcar pode conter 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose e 0,6% de frutose), 10% de fibras e o restante do material é distinguido entre materiais minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos.

O conteúdo calórico da cana, contabilizando a sacarose, fibras, água e outros, é de aproximadamente 1.060 Kcal Kg⁻¹. Somente o conteúdo energético do caldo de cana é de 620 Kcal Kg⁻¹, e quanto ao melaço (com cerca de 55% de açúcares redutores em peso), possui um valor energético de 1.930 Kcal Kg⁻¹ (EPE, 2014).

Para a produção de etanol em países europeus, utiliza-se polpa de beterraba, que corresponde a produção de etanol em países da União Europeia, que contém cerca de 20% a 25% de celulose, 25% a 36% de hemicelulose, 20% a 25% de pectina, em torno de 10% a 15% de proteínas e 1% a 2% de lignina (BELLIDO et al., 2015; İÇÖZ et al., 2009).

Conforme Janssen et al. (2010) o sorgo sacarino também pode substituir a produção de etanol de cana-de-açúcar, possuindo como vantagem, rapidez no ciclo de cultivo (4 meses), cultura mecanizável, e processo de extração semelhante ao utilizado na cana-de-açúcar. Produzindo de 40-60 t ha⁻¹ de sorgo, e produzindo cerca de 35 L t⁻¹ de etanol.

2.1.2. Ligninocelulósicos

Os compostos ligninocelulósicos são os biopolímeros mais abundantes na natureza (ALMEIDA, 2009). Os insumos ligninocelulósicos incluem palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos de fábricas de papel (LIMA et al., 2001).

A biomassa lignocelulósica é considerada como potencial matéria-prima para a produção de biocombustíveis. No entanto, a produção de biocombustíveis a partir de lignocelulose é mais onerosa do que a partir de amido de milho ou cana-de-açúcar, pois é um material resistente em seu processamento, sendo necessárias etapas adicionais, que encarecem a tecnologia (LEE et al., 2014).

Os recursos ligninocelulósicos são compostos principalmente por três elementos: celulose, hemicelulose e lignina (GÍRIO et al., 2010). Sendo apenas utilizáveis a celulose e hemicelulose, que possuem monômeros de açúcares, que serão convertidos via fermentação alcoólica para a geração de etanol. Na Tabela 1 são verificados os principais compostos de matérias-primas ligninocelulósicas para produção de etanol (KHOO, 2015).

Tabela 1: Composição química de algumas matérias-primas para o etanol

Componente (%)	Sabugo de milho	de Palha trigo	de Palha arroz	de Bagaço de cana	de Caroco de algodão
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0
Manose	0,3	0,8	1,8	-	2,1
Galactose	0,8	2,4	0,4	1,1	0,1
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6
Arabinose	3,2	2,4	4,5	2,5	2,3
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6
Cinzas	4,3	9,6	2,4	2,8	14,8
Proteína	4,0	3,0	-	3,0	3,0

Fonte: BON et al., (2008); adaptado.

A maior parte do etanol produzido mundialmente é derivado de amido e de caldo de cana-de-açúcar, entretanto, essas matérias-primas não são suficientes para a geração de combustíveis, pois possuem alta atuação na alimentação humana e animal, sendo uma forma de

contornar esse obstáculo, a utilização de biomassa ligninocelulósica (HASUNUMA e KONDO, 2012).

2.1.3. Amiláceas

Em comparação com os materiais sacaríneos, que possuem seus açúcares disponíveis facilmente, tanto o amido quanto a celulose necessitam ser convertidos em açúcares simples, para que sejam submetidos a fermentação (WESCHENFELDER, 2011). Os materiais que compõem essa categoria são os grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos (LIMA et al., 2001).

O milho apresenta-se com até 15% de água constitucional, além de 59% a 70% de extrativos não nitrogenados (amidos, pectinas e açúcares), 5% a 15% proteínas, 1,5% a 8,5% de ligninocelulósicos e 1,3% a 4% de cinzas (LIMA et al., 2001).

Segundo Klopfenstein et al. (2013), a produção de grãos de milho é altamente realizada desde meados de 1930 nos EUA, e devido a fatores que geram alta produtividade ($t\ ha^{-1}$), como a intensificação do sistema produtivo e o controle de fatores de produção, além do aumento na área de produção (ha), o país se tornou o maior produtor do grão. No ano de 2010 cerca de 41,8% da produção de milho foi vinculada para a geração de etanol, 42,9% para a ração de animais, e 11,2% para alimentação.

A batata-doce, é a principal matéria-prima para etanol na China, que corresponde a 85% da produção mundial do etanol de batata-doce. A principal limitação para o uso do material é de que as raízes, que possuem alto teor de sólidos, quando cozidas formam uma pasta com alta viscosidade, sendo que o processo de cozimento também exige alto gasto energético (ZHANG et al., 2013).

As matérias-primas amiláceas ainda são as mais comuns para a produção de etanol combustível em regiões de clima temperado (Europa, América do Norte, Ásia Central), no entanto a sua utilização pode acarretar nos preços alimentícios, mesmo que haja alta conversão desses insumos em etanol (Tabela 2) (PIETRZAK e KAWA-RYGIELSKA, 2014).

Tabela 2: Produtividade e rendimento de distintas matérias-primas amiláceas em comparação com a cana-de-açúcar.

Matérias-primas	Produtividade (t ha ⁻¹)	Rendimento (L t ⁻¹)
Cana-de-açúcar	60-120	90
Milho	7,5-10	370-460
Beterraba Sacarina	50-100	100
Sorgo Sacarino	40-50	35
Mandioca	15-20	110
Trigo	3	350
Arroz	7,5	420-450
Batata doce	8,7	300-400

Fonte: CONAB (2012); MILANEZ et al. (2014); MONTEIRO (2011); JANSSEN et al. (2010); SALLA (2008); SAHA et al. (2005); ZHU et al. (2015); WIDODO et al. (2015).

2.1.3.1. Milho (*Zea mays* L.)

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2006) nas características do grão, existem cinco classes de milho: dentado, duro, farináceo, pipoca e doce. Sendo a maioria do milho comercial nacional do tipo duro com variações entre semi-duro e semi-dentado, enquanto que em países com clima temperado, a predominância seja do milho dentado.

Na classificação botânica, o milho pertence à ordem *Gramineae*, família *Graminaceae*, sub-família *Panicoideae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, espécie *Zea mays*. O Gênero *Zea* é considerado monotípico e constituído por uma espécie, ou seja, *Zea mays* L. (do latim miliu) (SALLA, 2008; PISHGAR-KOMLEH et al., 2012).

Em conformidade com informações do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2015) está previsto para a safra 2015/2016 a produção de 75 milhões de toneladas de milho, com a área de cultivo 1% menor que na safra anterior.

As exportações brasileiras de milho, na categoria “exceto para semeadura”, no período entre 2010 até o mês de abril de 2015 podem ser visualizadas na Tabela 2, sendo que entre o ano de 2010 e 2014 houve um aumento de 92% nas exportações (BRASIL, 2015).

Tabela 3: Exportações de milho (exceto para semeadura) de 2010 a 04/2015

Período	US\$ FOB	Peso Líq. (ton)	US\$ Kg ⁻¹
01/2015 até 04/2015	962.842.600	5.129.366	5,33
2014	3.869.847.420	20.614.906	5,33
2013	6.247.628.396	26.606.621	4,26
2012	5.284.861.057	19.772.337	3,74
2011	2.624.194.064	9.459.143	3,60
2010	2.122.167.536	10.736.778	5,05

*US\$ FOB significa que o comprador assume todos os riscos e custos com o transporte da mercadoria, assim que ela está em traslado.

Fonte: BRASIL (2015).

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos de milho, estando na retaguarda apenas de países como Estados Unidos e China. O país produziu cerca de 75 mil toneladas do produto, nos anos de 2014/2015, sendo que exportou em torno de 20 mil toneladas. Na Tabela 3 é ressaltado o crescimento na produção nacional do milho, enfatizando os dados referentes a Segunda Safra, que obtiveram expressivo aumento (ABIMILHO, 2015).

Tabela 4: Oferta de milho no Brasil

	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13
Estoque inicial*	4.726	4.726	13.734	14.322	11.547	9.212	11.223
Produção Total*	50.979	58.220	50.608	52.582	53.749	70.907	83.462
Produção 1 ^a safra*	37.164	40.731	33.368	33.227	33.023	35.699	37.126
Produção 2 ^a safra*	13.815	17.489	17.240	19.355	20.725	35.699	46.336
Oferta Total*	59.001	66.012	67.875	69.867	68.352	83.450	87.597

*Dados em mil toneladas

Fonte: ABIMILHO, 2015.

O custo energético para a produção de um hectare de milho corresponde a 15.633,7 MJ ha⁻¹, sendo estes representados em sua maioria pelo consumo de insumos (em suma, herbicidas e inseticidas), cerca de 77% (SALLA et al., 2010).

De acordo com Nunes et al. (2008) e Carvalho et al. (2004) a composição química do milho (Tabela 4) é determinada principalmente por quatro elementos: amido, proteína bruta, lipídeos e fibra bruta.

Tabela 5: Composição média do milho.

Compostos	(%)
Umidade	10,93
Proteína	9,88
Lipídeos	4,17
Carboidratos	71,95
Fibras	1,71
Compostos minerais	1,36

Fonte: Belyea et al. (2004).

Devido a incidências de pragas, fez-se necessária a introdução de controle genético via modificações genéticas. A primeira tecnologia de milho geneticamente modificado, foi lançada no ano de 1996, nos EUA. Tal feito foi alcançado através de técnicas que permitiram a introdução de genes do *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) em plantas de milho, o que originou o milho geneticamente modificado, conferindo resistência da planta a algumas espécies de lepdópteros pragas (ARMSTRONG et al., 1995; CHAIVIVATRAKUL et al., 2014).

O melhoramento genético de plantas em conjunto com técnicas agrícolas, como: metodologia de cultivo, adubação, máquinas e mecanização, armazenamento de grãos e sementes, entre outros, geram ganhos substanciais na produtividade e minimizam a exploração por novas áreas de cultivo (ALBRECHT e MISSIO, 2013).

Outra modificação genética, foi a introdução da enzima alfa amilase termoestável no milho, para que ocorra uma eficiente hidrólise do amido (DUNWELL, 2014). O uso de milho geneticamente modificado com enzimas foi criado pela empresa Syngenta, com o nome de comercialização de Enogen[®], tendo empregabilidade liberada nos EUA, Japão, Austrália e outros países, e possuindo a finalidade de diminuir o custo produtivo e minimizar as etapas de produção de etanol (ISAAA, 2015).

Segundo a EMBRAPA (2015) para a safra de 2013/2014 foram disponibilizados 467 cultivares de milho, sendo 253 cultivares transgênicas e 214 convencionais. Dentre os quais 22 possuem genética nova, destes 19 são híbridos simples, 1 híbrido simples modificado, 1 híbrido triplo e 1 duplo.

O Brasil se destacou como o país que mais teve avanços na agricultura, pois as principais espécies produtoras de grãos apresentaram um ganho médio de produtividade aproximado de 50% num período de 34 anos (ALBRECHT e MISSIO, 2013).

No ano de 2005 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO, 2015) liberou a produção de milho geneticamente modificado no Brasil, sendo atualmente disponibilizados 15 eventos transgênicos para milho *Bt* (Tabela 5).

Tabela 6: Empresas, eventos, marcas, toxinas e data de liberação de eventos transgênicos de milho *Bt* no Brasil.

Empresa	Evento	Marca	Genes associados	Mês/ano
Monsanto	MON810	YieldGard®(YG,Y)	Cry1ab	Ago/07
Syngenta	BT11	AgrisureT®(TL)	Cry1ab	Set/07
Dow AgroSC.	TCI507	Herculex®(HX,H)	Cry1F	Dez/08
Syngenta	MIR162	Viptera®(VIP)	VIP3Aa20	Set/09
Monsanto	MON89034	YieldGardVTPRO®(PRO)	Cry1A105 (1Ab,1Ac,1F) +Cry2Ab2	Out/09
Syngenta	BT11 x MIR162 x GA21	Viptera3®(VIP3)	Cry1ab+VIP3Aa20	Nov/10
Monsanto	MON89034 x NK603	YieldGardVTPRO2®(PRO2)	Cry1A105 (1Ab,1Ac,1F) +Cry2Ab2	Nov/10
Monsanto	MON88017	YieldGardVTRootworm/RR2®	Cry3Bb1	Dez/10
Monsanto/Dow	MON89034 x TCI507 x NK603	Powercore®(PW)	Cry1A105 e Cry2AB2	Dez/10
DuPont/Pioneer	MON810 x NK603 x TCI507	Optimum Intrasect®	Cry1Ab+Cry1F	Jun/11
Monsanto	MON89034 x MON88017	VTPRO3®(PRO3)	Cry1A105-Cry2Ab2/ Cry3Bb1	Set/11
Syngenta	BT11 x MIR162 x MIR804 x GA21	Viptera3®(VIP3)	Cry1Ab+VIP3Aa+ Mcry3A	Set/14
Syngenta	MIR604	Syngenta Agrisure® RW	Mcry3A	Set/14
Dow	DAS- 40278-9	Enlist®	Aad-1v3	Mar/15
Monsanto	NK603	-	Cp4 EPSPS + PAT	Mar/15

Fonte: CTNBIO, (2015).

2.1.3.1.1. O amido

O amido é classificado de acordo com a sua estrutura físico-química e quanto a sua vulnerabilidade à hidrólise enzimática, como: amido glicêmico, que é subdividido em: rapidamente digerível, lentamente digerível; e o amido resistente (AR), sendo distinguido em três formas: AR 1, o amido fisicamente indisponível, AR 2 que possuem baixa digestibilidade devido a estrutura cristalina de seus grânulos, e o AR 3 que são polímeros formados após processo de gelatinização (LOBO e SILVA, 2003; WALTER et al., 2005).

Considerado como o maior estoque energético nos cereais, o amido possui formatos granulares ou particulares (MCGREGOR e BALLANCE, 1980). A amilose (15 a 25%) e amilopectina (75 a 85%) são os polissacarídeos que compõem o amido (MILES et al., 1984).

A amilose é essencialmente linear, possuindo moléculas D-glicose com ligações alfa-1,4, e a amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada, formada por cadeias curtas de D-glicose, com ligações 1,4 e ligações 1,6 nos pontos de ramificação (SILVA et al., 2008).

A amilopectina possui elevada massa molecular (10^4 a 10^6 Kg mol⁻¹), com tendência a se agregar em soluções aquosas, através das suas ligações de hidrogênio entre as cadeias (Figura 1), além de caracterizar a cristalização do amido (CORRADINI et al., 2005). Sendo sua cadeia molecular variável de acordo com a origem botânica, variedades em cada espécie e maturação da planta (LEE et al., 2014).

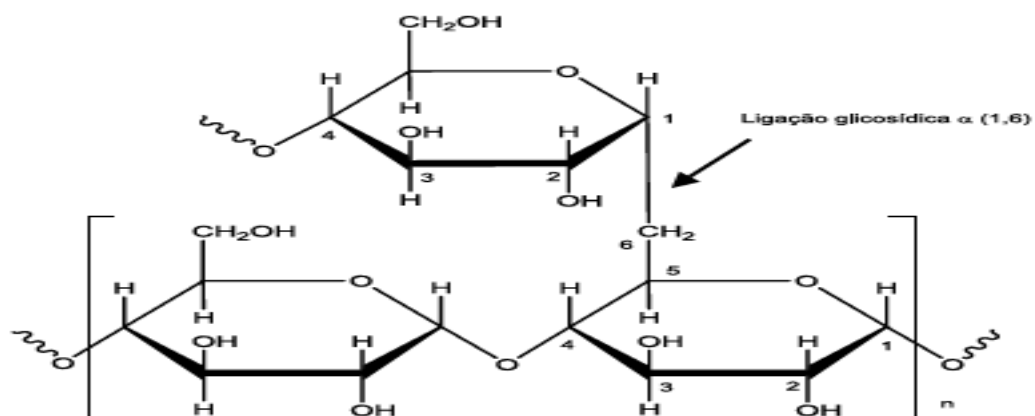


Figura 1: Estrutura química da amilopectina
Fonte: ALMEIDA, (2009).

O amido de milho possui em torno de 25% a 28% de amilose (WEBER et al., 2009), e possui efeito importante na caracterização estrutural do amido, devido a linearidade em sua cadeia química, proporciona resistência ao grânulo (CAI et al., 2014) (Figura 2).

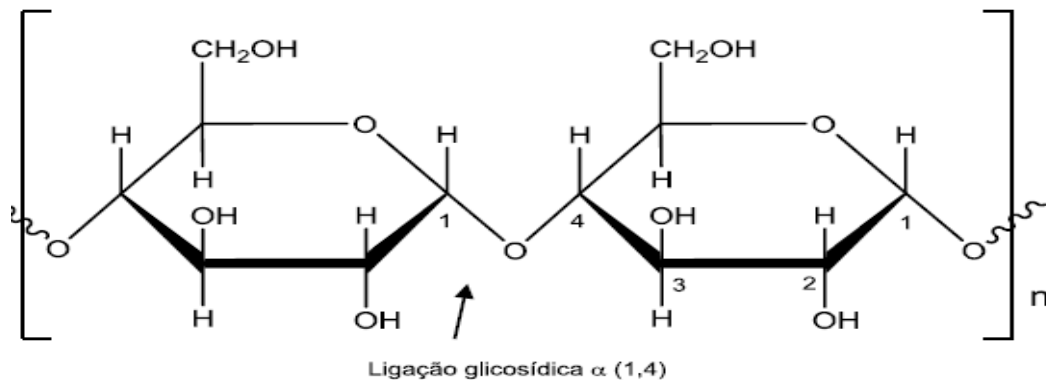


Figura 2: Estrutura química da amilose
 Fonte: ALMEIDA, (2009).

2.2.Enzimas

As leveduras e fungos filamentosos são os mais importantes sistemas de expressão eucariótica para a produção de enzimas, pois são organismos facilmente manipuláveis geneticamente, com elevadas taxas de crescimento e capazes de realizar modificações pós traducionais (BON et al., 2008).

Enzimas são proteínas formadas por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, e que possuem atividade catalítica. Em sua estrutura molecular podem estar integradas outras moléculas como carboidratos e lipídeos. Algumas enzimas necessitam de cofatores (moléculas menores) ou coenzimas (moléculas orgânicas), para que apresentem atividades catalíticas (LIMA et al., 2001).

De acordo com Bon et al. (2008) as enzimas possuem inibidores que são compostos que diminuem a velocidade reacional da enzima, podendo ser reversíveis ou irreversíveis. Sendo a inibição reversível provocada por distintos tipos de fomentadores, é recuperada com a diminuição da concentração de inibidor, e a irreversível é geralmente provocada por ligações covalentes entre moléculas inibidoras e a enzima.

Várias enzimas que participam no metabolismo do amido compartilham de uma característica estrutural comum: seu domínio catalítico se dobra como um cilindro. Em cada uma das enzimas o sítio ativo é constituído por resíduos de aminoácidos situados nos β -filamentos ou laços a partir dos C-terminais dos β -filamentos. As α -amilases são as enzimas mais estudadas pertencentes a este grupo, podendo catalisar a hidrólise de ligações α -1,4 (PARK et al., 1996).

2.2.1. Alfa-amilase

A alfa-amilase é considerada uma enzima com alto valor agregado, devido sua importância em processamentos como o de alimentos, fermentações, na fabricação de papéis e têxteis, produtos farmacêuticos, açúcar, amido, assim como em detergentes (GASHTASBI et al., 2014; SEN et al., 2014).

As principais fontes de obtenção da alfa-amilase comercial são a partir dos microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, e sendo também produzida via microrganismos recombinantes como: *Thermoactinomyces sp.* (doador do gene) e, como organismo hospedeiro, *Bacillus amyloliquefaciens* (BON et al., 2008).

Os fatores que tornam atrativos o uso dessa enzima são: alta especificidade, condições suaves de reação exigidas, termoestabilidade, fácil manipulação dos microrganismos produtores da enzima e elevada produtividade (SEN et al., 2014; KUMAR et al., 2013).

A α -amilase é uma enzima endoamilolítica (α -1,4-glicano 4-glicanohidrolase, EC 3.2.1.1.), que atua nas ligações glicosídicas α -1,4, nos teores de amilose e de amilopectina (TORABIZADEH et al., 2014). A maioria das α -amilases possuem uma conformação comum (α/β) 8-estrutura cilíndrica (Figura 3) (LÉVÊQUE et al., 2000).

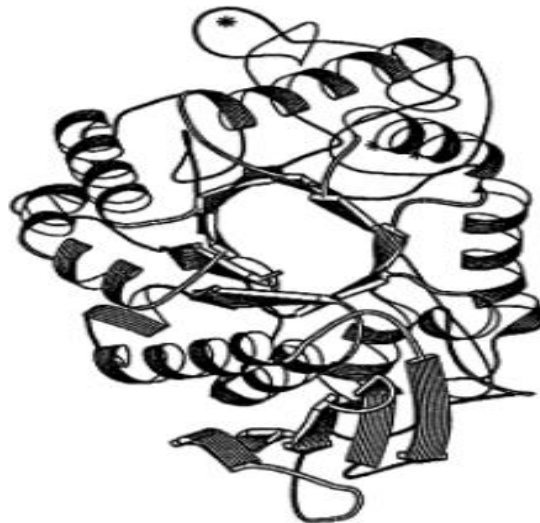


Figura 3: Conformação comum para alfa-amilases.
Fonte: LÉVÊQUE et al., (2000).

No processo de hidrólise enzimática do amido, a alfa-amilase é responsável pela liquefação do material, sendo otimizada nas condições de 90 °C e com pH 7, liberando os

compostos para sacarificação e posterior fermentação etanólica (TALEKAR et al., 2013; WARREN et al., 2011; WOLT e KARAMAN, 2007).

2.2.2. Amiloglucoamilase (glicoamilase)

A glicoamilase também é obtida por microrganismos, em seu formato comercial, sendo os principais: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* e *Rhizopus oryzae* (BON et al., 2008).

A amiloglucoamilase (Figura 4) é utilizada principalmente em processos de sacarificação do material hidrolisado liquefeito, clivando a glicose nas ligações α -1,4 e α -1,6-D-glicose de ramificações, atuando em temperatura média de 60 °C e com pH 5, para que não ocorram infestações bacterianas (TALEKAR et al., 2013; YAMADA et al., 2009; KOSUGI et al., 2009).

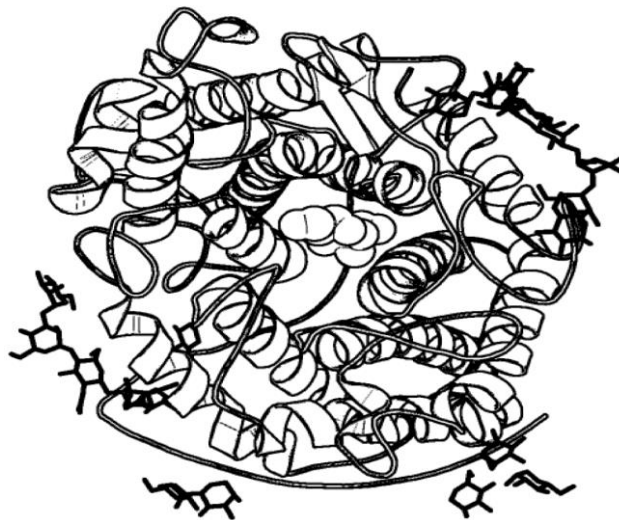


Figura 4: Estrutura cristalina do domínio catalítico da enzima amiloglucoamilase obtida a partir de *A. niger*.

Fonte: SFU, (2015).

Segundo Bagheri et al. (2014) há uma desvantagem ao se trabalhar com glicoamilase, pois ela exige temperaturas de atuação mais brandas que no processo de liquefação com alfa-amilase, o que requer um processo industrial a mais, para resfriamento do material e posterior sacarificação do mesmo com a enzima.

2.3. Leveduras

levedura no meio. Durante a fermentação alcoólica podem ocorrer intoxicações causadas pelo etanol gerado, inibindo o crescimento e causando pressão osmótica (YU et al., 2012). Por esse motivo são desenvolvidas tecnologias de produção de leveduras tolerantes a grandes quantias de etanol (YAMAOKA et al., 2014; KODAMA et al., 2013).

Em materiais ligninocelulósicos, um dos componentes da hemicelulose, a xilose, não pode ser naturalmente degradada por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo então empregadas alterações genéticas na levedura para que haja incremento na produção de etanol utilizando xilose (SAKIHAMA et al., 2015; ROMANI et al., 2015; MOON et al., 2013).

A perda de leveduras no processo fermentativo faz com que haja esforço científico para a produção de novas formas de introdução desses microrganismos no sistema, fazendo o uso de conformações floculares (LIU et al., 2015; ZHANG et al., 2014), encapsuladas (ISHOLA et al., 2015; PARAMERA et al., 2011), entre outras.

2.4.Etanol

De acordo com a legislação brasileira, o etanol é um combustível obtido a partir da fermentação alcoólica de biomassa renovável, que é destinado ao uso em motores a combustão interna, e que tem como principal componente o etanol (mínimo de 94,5% volume), estando especificado como etanol anidro combustível e etanol hidratado combustível. O etanol anidro deve conter no máximo 0,7% em massa de água, e o hidratado entre 4,5 a 7,5% em massa (BRASIL, 2015).

O etanol é considerado como um ótimo biocombustível, pois é biodegradável e renovável e pode ser produzido vantajosamente a partir de distintas biomassas (OMIDO et al., 2015).

Tecnologicamente o processo de produção de etanol no Brasil a partir de cana de açúcar já está amadurecido, o que permite que sejam trabalhados outros aspectos na geração, como o aumento da produtividade agrícola e melhorias industriais (LEITE e LEAL, 2007).

Em relação a outras alternativas de combustíveis, o etanol pode ser facilmente integrado a gasolina, com uma mistura de 5% a 25% sem que ocorram alterações nos motores atuais de combustão interna. Além de que, o etanol possui maior teor de oxigênio, utilizado como aditivo à gasolina, melhorando as propriedades antidetonantes (LI et al., 2015).

2.4.1. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é definida pelo conjunto de reações bioquímicas, que são dependentes de três fatores: a presença de açúcares, microrganismos que convertem o açúcar em álcool e dióxido de carbono, e que seja realizada em ambiente anaeróbico (PINTO et al., 2013; RESA et al., 2005).

Sendo realizada em quatro distintas operações: via batelada; em que uma quantidade fixa é alimentada no equipamento sendo processada e liberada, batelada alimentada; com a inclusão de poucos nutrientes no sistema juntamente com a matéria-prima, semicontínua; a vazão de entrada do material é menor que a vazão de saída, e contínua; quando a vazão de entrada é a mesma que a vazão de saída (COSTA et al., 2001).

O processo fermentativo se inicia quando a levedura entra em contato com o mosto, sendo dividido em três fases: pré-fermentação; quando ocorre a adaptação da levedura ao meio, fermentação; com desprendimento abundante de CO₂ e geração de álcool, e a pós fermentação; em que ocorre a redução da atividade fermentativa e celular (MORAIS, 2009; WANG et al., 2015).

2.4.2. Formas de Produção de etanol

As configurações de produção de etanol são primariamente distinguidas em: vias sintéticas, via fermentativa (FUGITA, 2010) e via destilatória (LIMA et al., 2001). Nas vias sintéticas a produção de etanol é por meio de reação de hidratação indireta do eteno e hidratação direta do eteno. Na via fermentativa encontra-se a fermentação a partir de matérias-primas sacaríneas, amiláceas e ligninocelulósicas (SOBOKAN e GLAVIK, 2000). E a via destilatória, é a produção de etanol a partir de vinhos, e que é mais empregada para o controle mercadológico de castas de vinhos (LIMA et al., 2001).

A reação de hidratação indireta do eteno ocorre (Figura 6) na passagem do eteno em um absorvedor que contém ácido sulfúrico de concentração 94% a 98% (m/m) a 55 °C a 80 °C com pressão de 9,8 a 34,5 atm. Os gases que não são absorvidos no sistema, principalmente etano e eteno, são separados e tratados para reciclagem da matéria-prima, e os produtos que foram absorvidos são submetidos a hidrólise, a temperaturas de 70 °C a 100 °C, com posterior lavagem com água ou NaOH diluído, e finalizando com a destilação dos ésteres para a obtenção do etanol (SILVA e CAMPOS, 2013).

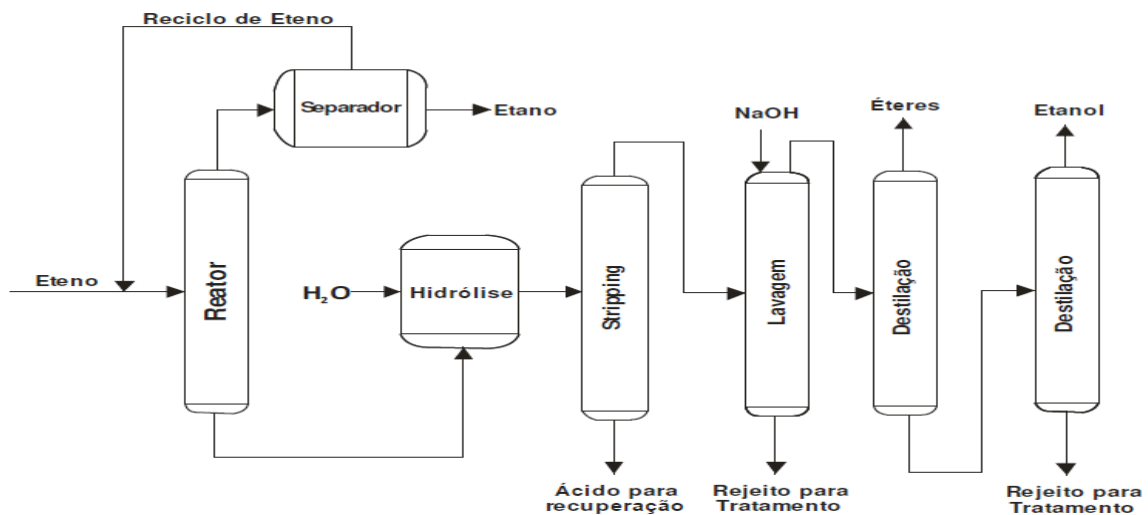


Figura 6: Processo de obtenção de etanol através de hidratação indireta do eteno.
Fonte: Silva e Campos, (2013).

No processo de hidratação direta do eteno é constituído por três seções: reação, recuperação e purificação, e produção do etanol. Primeiramente o eteno é misturado a água juntamente com um catalisador heterogêneo, normalmente de ácido fosfórico sobre sílica, em temperaturas reacionais que variam entre 210 a 325 °C, com pressão de atuação entre 30 a 100 atm. O processo possui baixa conversão em produto, sendo necessário o excesso de eteno na reação para melhor conversão, e após a geração de etanol, deverá ser recuperado o eteno e purificado para reutilização (Figura 7). Finalizando o processo com sucessivas destilações para recuperação de eteno, e de etanol (LLANO-RESTREPO e MUÑOZ-MUÑOZ, 2011).

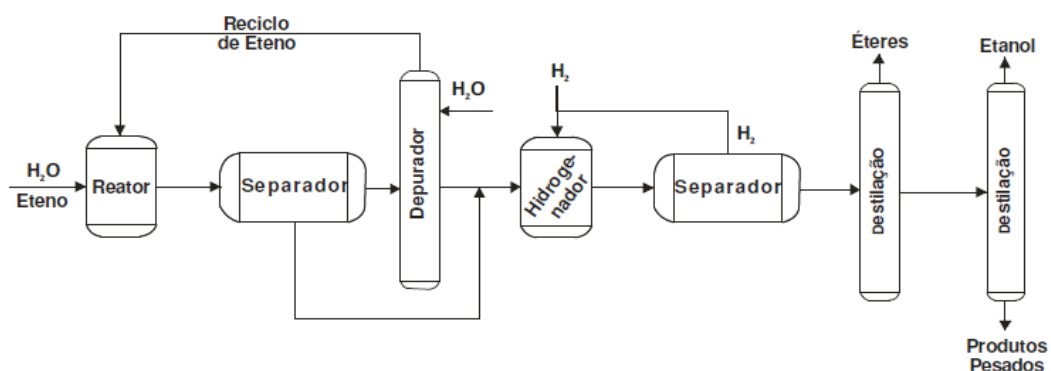


Figura 7: Processo de obtenção do etanol via hidratação direta do eteno.
Fonte: SILVA e CAMPOS, (2013).

Para a geração de etanol via fermentativa é necessário que sejam transformados recursos biológicos em energia, como sacaríneos, amiláceos ou biomassas ligninocelulósicas, e que

requerem condicionamento ou pré-tratamento para conversão via organismos fermentativos em etanol (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

O processo de produção de etanol de cana-de-açúcar (matéria-prima sacarínea) (Figura 8) é realizado com a lavagem do material, moagem do colmo da planta, purificação do substrato, aquecimento a 35 °C, fermentação do mosto, centrifugação ou separação das leveduras, e destilação 70 °C a 80 °C, para separação do etanol da água e outros compostos com pontos de ebulição mais acentuados (SILVA e CAMPOS, 2013).

O etanol de compostos amiláceos se difere do de sacaríneos por ser um material de maior complexidade. O milho é o maior representante dos compostos amiláceos para a produção de etanol, e como tal segue o processo via moagem, hidrólise utilizando enzimas alfa-amilase, e posterior sacarificação com enzima glucoamilase, em seguida, ocorre a liberação dos açúcares fermentescíveis. Com a inserção de leveduras no substrato, haverá o processo de liberação de etanol no meio, em que, ao finalizar essa etapa, será realizada a destilação para desagregação entre água e etanol (OLSZEWSKI, 2015).

E para materiais ligninocelulósicos que não possuem açúcares simples prontamente disponíveis para fermentação, é necessário que sejam convertidas a celulose e hemicelulose em monossacarídeos (JUNG et al., 2013). Utilizando métodos químicos/biológicos/físicos para liberação desse material no substrato, para que posteriormente seja fermentado e destilado (SINGH et al., 2014).

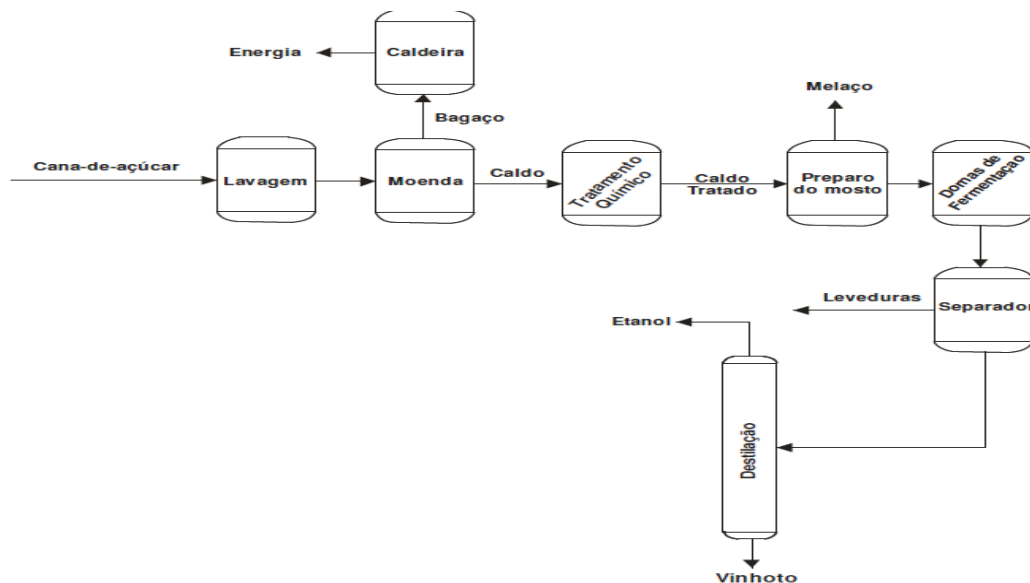


Figura 8: Processo de obtenção de etanol via fermentativa utilizando cana de açúcar.
Fonte: SILVA e CAMPOS, (2013).

2.4.3. Panorama

A inserção do etanol nas políticas públicas ocorreu em 1975, com o Programa Brasileiro de Etanol (PRÓ-ALCOOL), em que consistia em minimizar os impactos causados pela crise do petróleo, desenvolvendo o uso do etanol combustível (MASIERO e LOPES, 2008).

Em 1979 houve a segunda crise petrolífera, em que o governo brasileiro decidiu pelo aumento na produção de etanol, sendo então implantadas destilarias independentes. Nos anos posteriores ocorreu uma queda brusca e acentuada no preço do petróleo, gerando estagnação na produção do biocombustível (DIAS et al., 2015).

Segundo Barros et al. (2014) no fim da década de 1980 foram executadas medidas que garantiram a expansão do consumo do etanol de forma sustentável. Estando correlacionada com essas medidas, a criação de veículos com motores *flex-fuel*, que atuam tanto com gasolina quanto com etanol.

Juntamente com os EUA, o Brasil tem dominado nas produções de etanol mundialmente (JONKER et al., 2015). Atualmente estão em operação 376 plantas produtoras de etanol ratificadas no país, correspondendo a uma capacidade autorizada de $197.961 \text{ m}^3\text{dia}^{-1}$ de etanol hidratado e de $101.293 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ de etanol anidro (BRASIL, 2014).

As perspectivas para o etanol na região da América Latina é visualizada como favorável, pela potencialidade de produção, pela disponibilidade de terras e pelo clima. E impactada pelos fatores positivos de produção, a região pode se tornar grande exportadora do produto, sendo necessárias reduções das barreiras alfandegárias (LORA e VENTURINI, 2012).

2.5. Etanol de milho

Produção de etanol a partir do milho, para utilização como combustível de transporte, é considerada uma tecnologia madura, utilizada nos Estados Unidos desde meados de 1900 (BOTHAST e SCHLICHER, 2005).

Nos EUA houveram iniciativas para obtenção de mais combustíveis a partir de fontes renováveis, aumentando o subsídio na produção de etanol de milho. Subsidiados por meio de políticas públicas, como o crédito de imposto especial sobre o consumo de etanol e do crédito fiscal do pequeno produtor de etanol (MAXSWELL e DAVISON, 2014; USDA et al., 2002). O milho é responsável por ser a matéria-prima de mais de 90% do etanol produzido nos EUA (MORRIS e HILL, 2006).

De acordo com Milanez e colaboradores (2014) o ciclo produtivo do milho é de 4 meses, sendo que possui a vantagem da armazenagem dos grãos, e também da produção de milho safrinha. Notadamente possui algumas desvantagens produtivas em comparação com o etanol de cana-de-açúcar, no entanto, o milho consome menos água (mm) no ciclo até a colheita, além de que o custo de colheita é menor.

As alterações espacial e temporal em condições de solo e clima, as práticas de manejo e a irrigação local, causam uma variação no rendimento de grão, dentro e entre regiões, que sejam produtoras de grãos (PERSSON et al., 2009).

A produção de etanol combustível a partir de milho nos EUA atingiu 54,2 bilhões de litros no ano de 2014, sendo que o crescimento da produção de etanol superou o crescimento do milho consumido como matéria-prima. Se os rendimentos industriais de etanol tivessem permanecido nos níveis do ano de 1997, seria necessário moer um adicional de 7% de milho, para produzir a mesma quantidade de biocombustível (EIA, 2015).

A geração de etanol a partir do milho apresenta a necessidade de fragmentação do material amiláceo. Sendo a moagem a seco o método mais aplicado industrialmente, em que o milho é moído sem a utilização de água, formando farinha de milho, que posteriormente é miscigenado em água formando uma solução. Após a solubilização são introduzidas enzimas para conversão do material em açúcares, e então é fermentado por leveduras, formando o etanol (WOOD et al., 2014; CINELLI, 2012).

No processo produtivo são obtidos coprodutos, como: proteínas, minerais, gorduras e fibras, e que caso seja realizada a moagem a seco, obtém-se sob a forma de grãos molhados de destilaria (DWG) ou grãos secos destilados com solúveis (DDGS), enquanto que no processo de moagem úmida forma-se a farinha de glúten de milho, e estes coprodutos são utilizados amplamente na alimentação animal, substituindo o farelo de milho (RFA, 2011; DICKEY et al., 2002; GU et al., 2015).

De acordo com Murthy e colaboradores (2009) que analisaram 11 híbridos de milho para a produção de etanol, utilizando a moagem a seco como forma de fracionamento do material, obtiveram a concentração de etanol entre 12,7% a 13,7%. Salientando que o tipo de milho, as enzimas e leveduras utilizadas, além das condições de fermentação, afetam o rendimento final em etanol, e que a quantidade de amido nos grãos não está necessariamente correlacionada com a produtividade em etanol.

Segundo Naidu et al. (2007) o tamanho da partícula do material interfere na produtividade de etanol, onde testou-se os tamanhos de 0,5, 2, 3, 4 e 5 mm. O tamanho de

partícula que obteve maior quantidade de etanol, foi o de 0,5 mm, gerando 26 mL de etanol em 100 mL de água, além de que, essa granulometria garantiu maior quantidade de sólidos solúveis.

A economia da geração de etanol é significativamente influenciada pelo custo dos insumos, correspondendo a metade do valor do produto final. Os processos de produção de etanol da partir de milho possuem produtividade em área (entre 7,5 a 10 t ha⁻¹) pouco competitiva e exigem longos tempos de fermentação. Apesar disso, o desenvolvimento processual e industrial potencializam a redução de custos (KRISHNAN, 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Localização

O presente ensaio foi conduzido na estação experimental da Cooperativa Agroindustrial C.Vale, em Palotina, localizado a 24°20'42.77" S e 53°51'35.95" O, e na Fazenda Salomão localizada na comunidade São Cosme e Damião, em Assis Chateaubriand, com localização a 24°16'9.69" S e 53°39'38.37" O, no Oeste do Estado do Paraná, na segunda safra do ano agrícola 2014/2015, referente ao período de fevereiro a junho de 2015.

De acordo com as classificações de Köppen e Geiger (2015), o clima da cidade de Palotina e Assis Chateaubriand são classificados como Cfa, que possui clima temperado quente, com inexistência de estação seca definida e com verão quente (Figura 09). As altitudes das cidades são de 305 metros acima do nível do mar para Palotina, e 406 metros acima do nível do mar para Assis Chateaubriand.

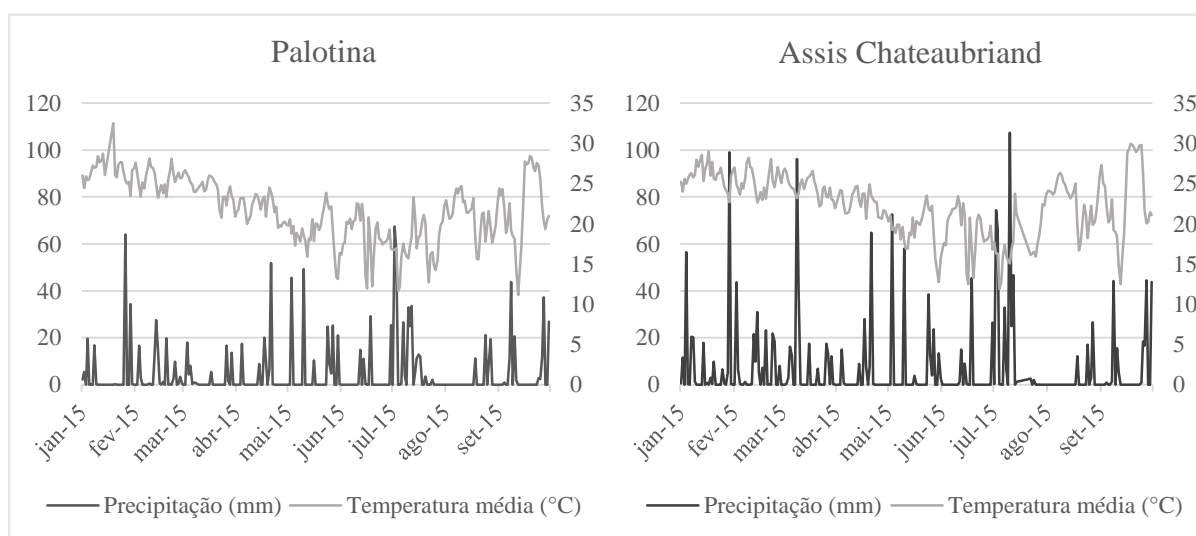


Figura 9: Dados meteorológicos das cidades de Palotina e Assis Chateaubriand.

Foram instalados experimentos utilizando-se delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas de 6 linhas (0,45m x 5m) e população de plantas equivalente a 60 mil plantas ha⁻¹. Os tratamentos consistiram em 09 híbridos de milho com diferentes tecnologias transgênicas e um híbrido “convencional” não *Bt*, e não houve aplicação de inseticida.

Os solos utilizados nos experimentos foram caracterizados como: Latossolo Vermelho eutroférico típico, para a área experimental da Cooperativa Agroindustrial C.Vale

(EMBRAPA, 2006), com textura argilosa (7,8% de areia, 10,5% de silte e 81,6% de argila), em relevo plano (0,01 m/m de declividade). E o solo da área de Assis Chateaubriand também é classificado como Latossolo Vermelho eutroférico típico (EMBRAPA, 2006), com teores de argila, areia e silte total de: 65, 10 e 25% respectivamente. O relevo também é considerado plano (0,01 m/m de declividade).

Os resultados da análise química do solo, realizada antes da instalação do experimento (Tabela 7), revelam os teores de nutrientes que se encontram nos solos na área de Palotina e Assis Chateaubriand.

Tabela 7: Características químicas dos solos dos experimentos. Palotina e Assis Chateaubriand, PR, setembro de 2014.

Local	Prof.	P	MO	pH	H+ Al	Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V	Al
	cm	mg dm ³	g dm ³	CaCl ₂	cmol _c dm ³							%	
Palotina	0-10	50,7	17,2	5,80	2,3	0,00	0,25	3,87	0,92	5,04	7,40	68,1	0,0
	10-20	44,2	14,4	5,50	2,9	0,00	0,16	3,14	0,80	4,10	7,05	58,2	0,0
Assis Chat.	0-20	14,9	37,5	5,3	4,2	0,00	0,44	5,89	2,01	8,34	12,62	66,09	0,0

3.2. Híbridos cultivados

Os híbridos utilizados estão de acordo com a Tabela 8, em que foram empregados sem o implemento de fitossanitários. A semeadura dos híbridos foi realizada no dia 12/02/2015 (Palotina) e 13/02/2015 (Assis Chateaubriand), sendo a colheita, realizada nos dias 13/07/2015 (Palotina) e 16/07/2015 (Assis Chateaubriand). Apenas o híbrido 1 não possui tecnologia *Bt*, os outros utilizados contém a tecnologia.

Tabela 8: Híbridos cultivados em Palotina e Assis Chateaubriand

Híbridos	Nomenclatura	Marca	Período de cultivo	Grãos
1	DKB290 ("convencional" não <i>Bt</i>)	Dekalb	1ª Safra	Semidentado
2	DKB315 VTPRO	Dekalb	2ª Safra	Duro
3	DKB340 VTPRO2	Dekalb	2ª Safra	Semiduro
4	DKB290 VTPRO3	Dekalb	1ª Safra/2ª Safra - cedo	Semidentado

5	Fórmula TL	Syngenta	2ª Safra - cedo	Semiduro
6	Defender Viptera	Syngenta	1ª Safra	Duro
7	Status Viptera 3	Syngenta	2ª Safra - cedo	Duro
8	2b810 PW	Dow AgroSciences	2ª Safra	Semiduro
9	30F53 YH	DuPont Pioneer	2ª Safra	Semiduro
10	BG7330 H	Biogene	2ª Safra - tardio	Semiduro

3.3. Análises

3.3.1. Teor de umidade dos grãos de milho

O método utilizado foi o de estufa a 105 ± 3 °C, adaptação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2009), peso amostral em torno de 50 g, e realizando as análises em triplicata.

Os recipientes utilizados foram aquecidos em estufa por 105 °C durante 30 minutos, para eliminação de qualquer resquício de umidade, sendo em seguida resfriados em dessecador.

A primeira pesagem foi realizada em balança analítica com o recipiente retirado do dessecador, e o valor foi aferido (t), para posteriores cálculos. Os grãos inteiros foram adicionadas ao recipiente, sendo realizada uma nova pesagem, anotando-se o conseguinte valor (P).

Após as duas pesagens, os recipientes foram alocados em estufa a 105 °C, e iniciando a contagem do tempo de secagem somente a partir da temperatura ter sido alcançada. Foram mantidas as amostras em estufa por 24 horas.

Posterior ao período de secagem os recipientes com as amostras foram retirados da estufa e resfriados em dessecador, e posteriormente pesados e seus valores, registrados (p).

Os cálculos de porcentagem de umidade utilizam a Eq. 1, abaixo:

$$\% \text{ de Umidade} = \frac{100 (P-p)}{p-t} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente mais o peso da semente úmida;

p = peso final, peso do recipiente mais o peso da semente seca;

t = tara, peso do recipiente.

3.3.2. Estimativa de produtividade por hectare

A produtividade foi estimada a partir do rendimento de grãos na área útil das parcelas. A área útil de colheita em Palotina compreendeu 1,8 m² por parcela e em Assis Chateaubriand 3,6 m², sendo as mesmas determinadas em Kg ha⁻¹, para cada genótipo e repetição. Para o cálculo do rendimento de grãos por parcela, o grau de umidade dos grãos foi determinado conforme supramencionado (EMATER, 2000) sendo corrigida para 13% base seca (MAPA, 2009).

3.3.3. Teor de amido

A análise foi realizada de acordo com adaptação da metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008) em que pesou-se 5 g de amostra moída utilizando cápsula de porcelana, sendo tratadas posteriormente com três porções de 20 mL de éter. Após agitação e decantação, o material foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL, com o auxílio de 100 mL de álcool a 70%.

Agitou-se e aqueceu-se em banho-maria a 83-87 °C, por 1 hora. Após esfriado, foram adicionados 50 mL de álcool 95% e filtrados em filtro seco. O resíduo foi lavado com 500 mL de álcool 70%, reunindo-se as soluções de lavagem ao que foi filtrado.

O resíduo e o papel filtro foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, com o auxílio de 150 mL de água. Foram adicionadas 5 gotas de solução de hidróxido de sódio a 10%. Aqueceu-se em autoclave a 1 atmosfera por uma hora, e após esfriamento do material, foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico. Aquecendo-se novamente em autoclave por 30 minutos e neutralizando, posteriormente, com solução de hidróxido de sódio a 10%.

O material foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e foi completado com água destilada. Agitou-se e filtrou-se a seco o material. Determinando-se na Equação 2, abaixo, a quantidade de amido presente no material.

$$\frac{100 \times A \times 0,9}{P \times V} = \text{em porcentagem (m/m)} \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo:

A: número de mL da solução P g da amostra;

P: número de gramas da amostra;

V: volume de mL da solução gasta da titulação.

3.4. Produção de etanol de milho

Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra, sendo submetidas à moagem em moinho do tipo martelo, a seco e com peneiramento em malha de 1,0 milímetros (MURTHY et al., 2009). Após moagem, 50 gramas do material foram ressuspensos em água para formar uma solução de concentração de 25% (m/m) de material amiláceo. As enzimas e leveduras utilizadas foram cedidas pela empresa LNF Latino Americana[®].

3.4.1. Hidrólise

A metodologia de hidrólise enzimática do amido de milho foi baseada e adaptada a partir dos trabalhos dos autores Fugita (2010), Baptista et al. (2013) e Murthy et al. (2009), ocorrendo o aquecimento dos Erlenmeyers que contiveram as soluções de milho com água em banho-maria metabólico com agitação orbital do tipo Dubnoff a 80 °C para gerar a gelatinização, em seguida foi ajustado o pH amostral para 5,5. Após ajuste de pH foi adicionado 0,28 mL da enzima alfa-amilase Termamyl 2X da Novozymes[®], a temperatura de 90 °C, mantendo por 90 minutos sob agitação.

3.4.2. Sacarificação

Para finalização do processo de clivagem do amido, com a sacarificação, foi arrefecido a 60 °C com pH ajustado para 4,2 (utilizando ácido sulfúrico 1,0 N), sendo então adicionado 0,56 mL da enzima glucoamilase AMG 300L da Novozymes[®] e ureia (1 g L⁻¹ de mosto), sob agitação durante 90 minutos.

3.4.3. Teor de sólidos solúveis totais (TSST)

A determinação da quantidade de soluto disponível no meio é possível pelo conhecimento do índice de refração da solução aquosa, em que essa propriedade é utilizada para determinar a concentração de sólidos solúveis em soluções aquosas, sendo que esses sólidos são em sua maioria açúcares livres.

O índice de refração para uma substância pura é constante, mantendo-se as condições de temperatura e pressão, pode ser usado como meio de identificação da mesma. A presença de sólidos solúveis na água resulta numa alteração do índice de refração.

A medição do TSST foi realizada antes e após a fermentação. Primeiramente, foi verificado quanto de glicoses foram liberadas na solução aquosa com a ação enzimática, sendo aferida como Sólidos Solúveis Iniciais, posteriormente, com a fermentação, as leveduras teriam (teoricamente) convertido a maior parte das glicoses, e o teor de sólidos solúveis tenderia para menos que a quantidade inicial, estando nominado como Sólidos Solúveis Finais.

A análise foi realizada via refratômetro digital, que após calibração com água, dispõe dos valores em °Brix para as amostras analisadas. Caso houvesse alterações de temperatura (acima ou abaixo de 20 °C) foram realizadas correções nos valores finais de acordo com tabulações do Instituto Adolfo Lutz (2008).

3.4.4. Fermentação

Após a hidrólise e sacarificação, realizou-se o processo de fermentação do material, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com resistência a altas concentrações de álcool, da empresa LNF[®], estando na concentração de 3% (m/v), por 72 horas a 30 °C em reator de fermentação, mantendo a solução sob agitação (MURTHY et al., 2009).

3.4.5. Quantificação do teor de etanol no mosto

O teor alcoólico foi avaliado utilizando o método por ebulliometria, com o auxílio de um ebulliômetro, que averigua o aumento na temperatura de ebulição do solvente quando nele dissolve-se um soluto não volátil (CARVALHO et al., 2008).

Primeiramente foi realizado o teste do ebulliômetro somente com água. Adicionou-se água ao condensador afixado sobre o ebulliômetro e no reservatório sob o mesmo, aqueceu-se o equipamento até o momento que ocorresse a ebulição. Anotou-se a temperatura, calibrando-se a régua para posterior análise do teor alcoólico.

Para análise final, foi adicionado o mosto fermentado no condensador e no reservatório, observou-se a temperatura em que a amostra entrou em ebulição e juntamente com a régua calibrada, determinou-se o percentual alcoólico da mistura.

3.5. Análise estatística

Os dados foram analisados conforme Pimentel-Gomes e Garcia (2002). Após a experimentação, foram analisados os dados utilizando os softwares LibreOffice e Sisvar[®] (FERREIRA, 2011), em que as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($\leq 0,05$).

A Matriz de Correlação ($\leq 0,05$) também foi aplicada entre as médias, para averiguar a importância e a dependência das variáveis entre si. Da mesma forma foi realizada a Análise de Contraste ($\leq 0,05$), para os tipos de grãos utilizados, verificando se as características dos grãos inferem nas variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises estatísticas e as discussões pertinentes estão destacadas nos subitens em questão, sendo que as tabelas contendo a Análise de Variância de cada variável estão nos Anexos 2 e 3.

4.1. Teor de umidade dos grãos de milho

Em termos de umidade dos grãos (Figura 10), o híbrido que mais teve característica úmida foi o de número 10, o Biogene 7330 Herculex (BG7330H), tanto para Assis Chateaubriand quanto para Palotina, com 29,03% e 33,96% de umidade (sendo estatisticamente semelhante aos híbridos 9, 8 e 7), respectivamente.

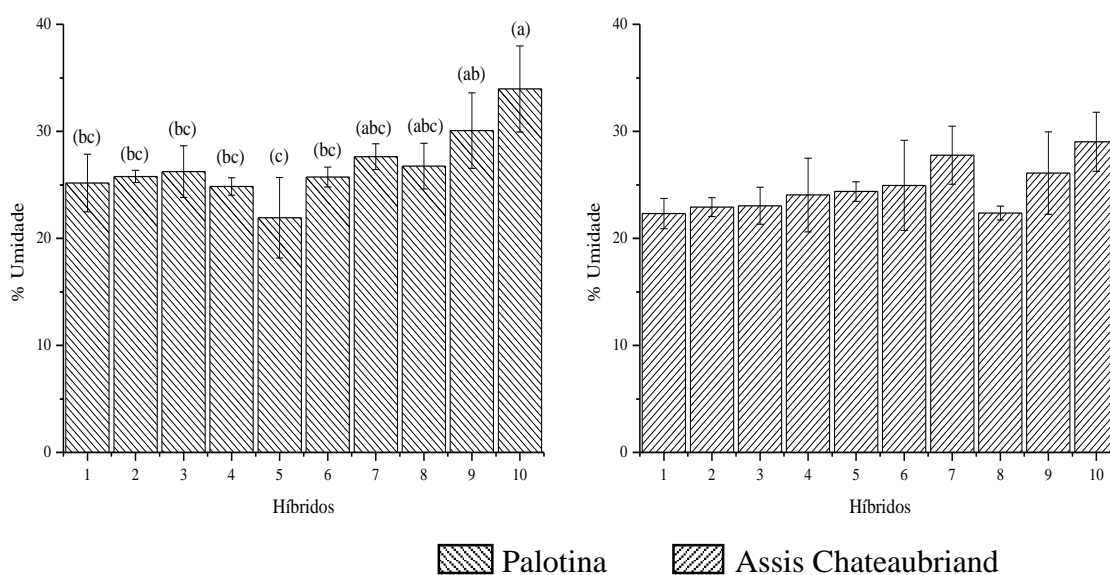


Figura 10: Teor de umidade para os híbridos de Palotina (CV: 11,39; DMS:7,43) e Assis Chateaubriand (CV: 0,00; DMS: 0).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

No que tange ao menor teor de umidade, reserva-se os híbridos 1, DKB290 (Dekalb 290) para Assis Chateaubriand e o híbrido 5, Fórmula TL (Syngenta) para Palotina, com 22,33% e 21,92% de umidade, respectivamente.

A umidade presente nos grãos foi resultado da alta intensidade pluviométrica entre os dias 30/06 a 12/07, com 385 mm para Assis C. e 272 mm para Palotina, atrasando a colheita que estava prevista para os dias 01/07 (Palotina) e 02/07 (Assis Chateaubriand), recaindo

também em termos de quantidade de material colhido, pois foi averiguado perda por acamamento do híbridos.

4.2. Estimativa de produtividade de grãos (Kg ha^{-1})

A produtividade de biomassa em grãos de milho, Kg ha^{-1} , obtida nos experimentos se diferenciou estatisticamente no que tange aos híbridos e aos locais experimentais, como está destacado na Figura 11, abaixo:

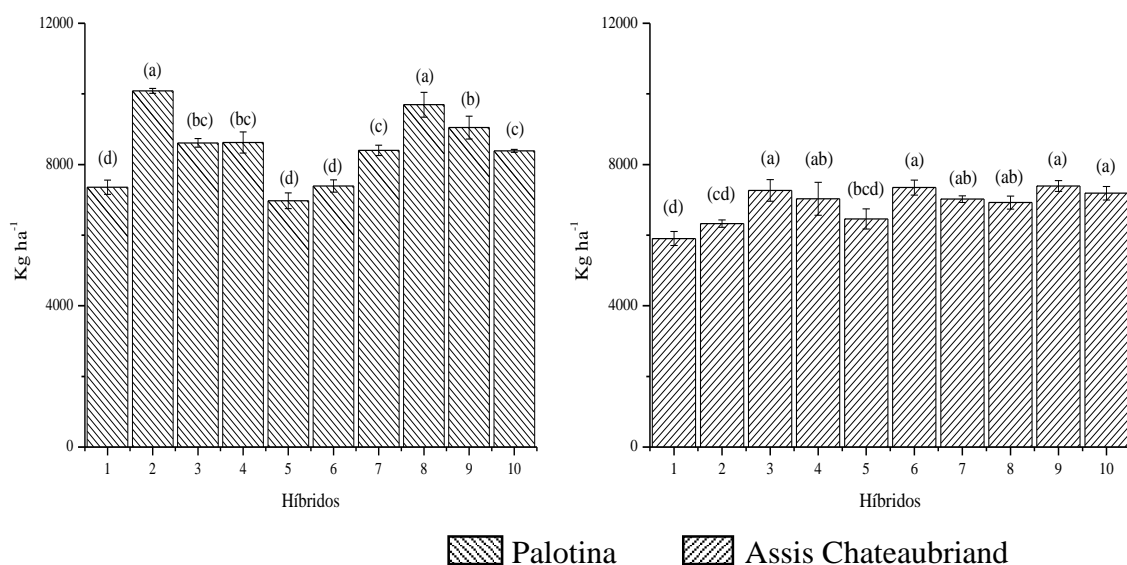


Figura 11: Produtividade de biomassa em Kg ha^{-1} , para Palotina (CV: 3,10; DMS:637,39) e Assis Chateaubriand (CV: 4,10; DMS: 686,09).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

Para Assis Chateaubriand o híbrido que se destacou foi o de número 9 (30F53 YH), com $7.392,2 \text{ Kg ha}^{-1}$, mas que estatisticamente apenas se diferenciou dos híbridos 5, 2 e 1, permanecendo semelhante ao restante. O híbrido que menos produziu por hectare foi o de número 1 (DKB290), com $5.904,1 \text{ Kg ha}^{-1}$.

Em Palotina destacaram-se os híbridos 2 (DKB315 VTPRO) e 5 (Fórmula TL), sendo que o primeiro foi o que mais produziu (em termos gerais) com $10.085,2 \text{ Kg ha}^{-1}$, que estatisticamente é igual ao híbrido 8, e o segundo foi o que menos produziu na área experimental da Palotina, com $6.975,4 \text{ Kg ha}^{-1}$.

As distinções entre os locais se devem a características de solo (CAIRES et al., 1999; FREDDI et al., 2006), necessidades nutricionais das plantas (GONÇALVES JÚNIOR et

al.,2007; LÁZARO et al., 2013), e a disponibilidade de água, principalmente do pendoamento da planta até o início do enchimento dos grãos, com média de 10 dias sem chuvas no período (BERGAMASCHI et al., 2006).

A umidade no período final do ciclo produtivo também inferiu nos resultados da variável de produtividade, estando correlacionada com 24% na produtividade do campo experimental de Assis Chateaubriand e 21% para o campo experimental de Palotina.

4.3. Teor de amido

Para a análise de teor de amido se distinguiu entre os campos experimentais (Figura 12), ocorrendo significância estatística que os diferenciasses. Para Assis Chateaubriand ressaltou-se o híbrido 7 (Status Viptera3), com 69,40% de amido em sua composição, e o híbrido 1 (DKB290), com menor percentual de amido, com 62,4%. Em Palotina identificou-se o híbrido 9 (30F53 YH) com maior percentual de amido, com 67,85%, e, o híbrido com menor composição em amido foi o de número 4 (DKB290 VTpro3), com 60,77%.

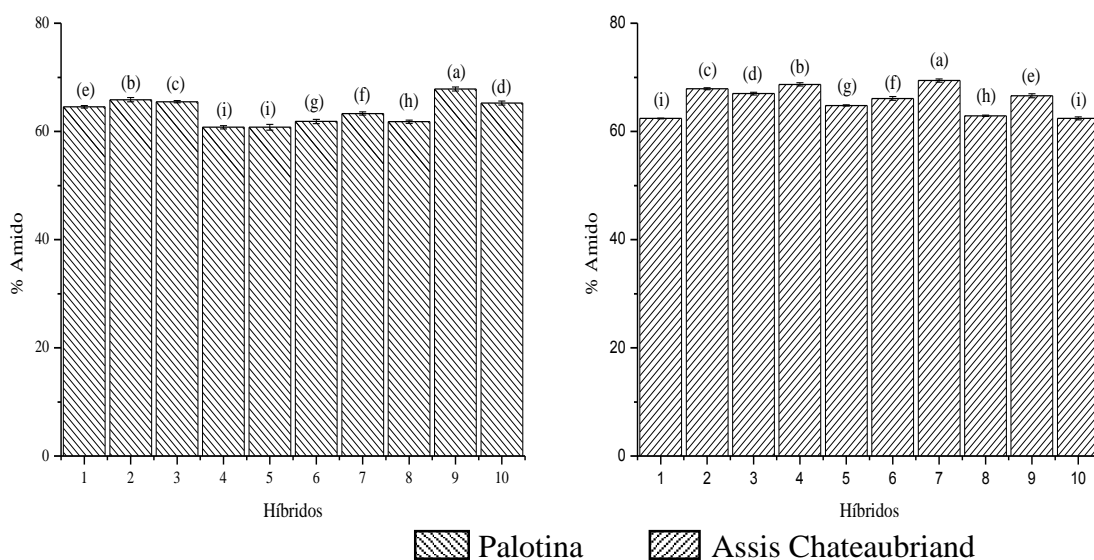


Figura 12: Teor de amido para os híbridos de Palotina (CV: 0,46; DMS:0,74) e Assis Chateaubriand (CV: 0,63; DMS: 0,97).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

De acordo com Embrapa (2006) e Luz et al. (2014) o estresse hídrico no estágio R2 dos grãos, afeta a fotossíntese e a formação de grânulos de amido, fazendo com que ocorram perdas

na produção final de amido. O estágio R2 das plantas ocorreu entre a segunda quinzena do mês de março e a primeira quinzena do mês de abril, em que houve uma queda do índice pluviométrico, com média pluviométrica de 70 mm para os campos experimentais, mas que não foi acentuada a ponto de gerar grandes perdas de amido em todos os híbridos.

Também ocorreram grãos ardidos em algumas amostras, devido ao acréscimo de chuvas durante a maturação dos grãos, em que umidades acima de 20% promoveram a podridão das espigas e o desenvolvimento de fungos nos grãos, gerando uma queda no percentual de amido (EMBRAPA, 2005; FERNANDES, 2014).

4.4. Teor de sólidos solúveis iniciais

O teor de sólidos solúveis iniciais descrito como °Brix inicial (Figura 13), que verifica a quantidade de glicose disponível na solução, obteve um destaque quanto ao híbrido, pois o híbrido que mais teve °Brix, previamente a fermentação, para o campo experimental de Palotina, foi o mesmo que teve o pior desempenho em °Brix para as amostras de Assis Chateaubriand.

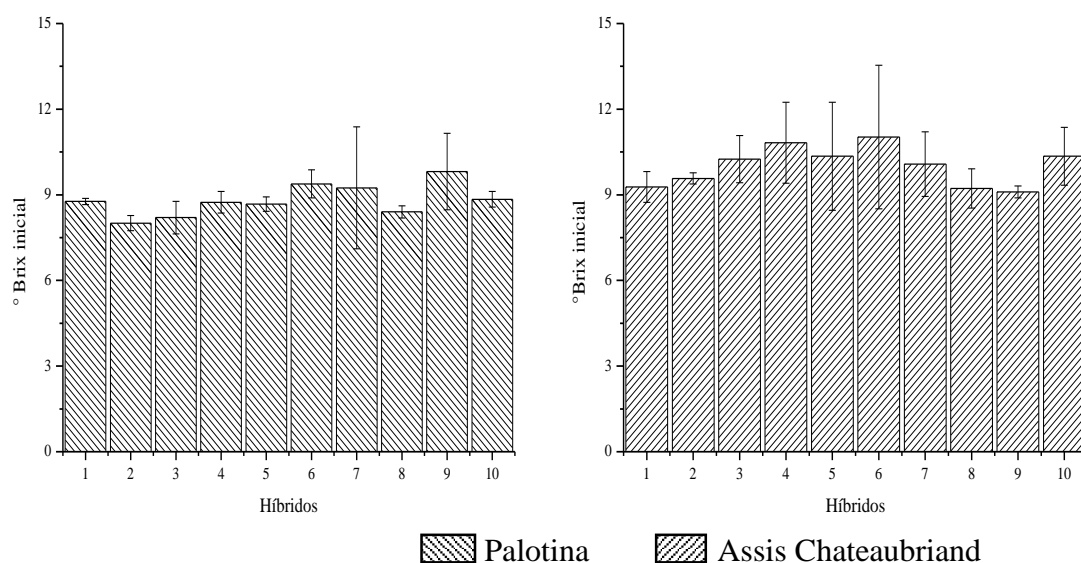


Figura 13: Teor de sólidos solúveis iniciais para os híbridos de Palotina (CV: 10,97; DMS:2,34) e Assis Chateaubriand (CV: 14,07; DMS: 3,42).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

O híbrido mais relevante dentre as amostras de Assis C. foi o de número 6 (Defender Viptera), com 11,03 °Brix, e o híbrido com menor conversão em açúcares simples, foi o híbrido 9 (30F53 YH), com 9,10 °Brix. Para as amostras de Palotina, o híbrido 9 (30F53 YH), foi o que

mais converteu em açúcares simples, com 9,82 °Brix, enquanto que o híbrido 2 (DKB315 VTPRO), foi o que menos obteve, com 8,01 °Brix.

O híbrido 9 se destacou no experimento de Palotina, mas foi o híbrido de menor relevância em Assis Chateaubriand. No entanto o seu desempenho foi equilibrado, obtendo 9,82 °Brix (Palotina) e 9,10 °Brix (Assis C.), o que denota que teve equidade nos diferentes campos experimentais, apesar das condições edafoclimáticas distintas.

Os híbridos 6 e 2 são classificados como grãos duros, e apesar dessa característica os dois tiveram comportamento diferente, pois teoricamente, quanto maior a dureza, maior proporção de endosperma vítreo, devido a alta densidade do arranjo dos grânulos de amido com proteínas, deixando o amido relativamente indisponível para degradação enzimática e conversão em açúcares (CANTARELLI et al., 2007).

A quantidade de amido presente nos dois híbridos (6 e 2) também foi correspondente, com 66,10% de amido (híbrido 6) e 65,87% amido (híbrido 2), sendo que o amido possui proporções de amilose e amilopectina, e a variação desses componentes é causada em função do genótipo e do grau de maturação do grão (VIEIRA NETO, 2006).

Quanto maior o teor de amilose nos grãos, menor é a digestibilidade efetuada pelas enzimas, liberando menores quantidades de açúcares simples. Supõe-se que, o híbrido 2 obteve desempenho menos significativo, em quantidade de açúcares, devido ao fato de possuir maior quantidade de amilose, dificultando a conversão do amido em açúcares (PIOVESAN, 2009; LIN et al., 2016).

As características morfológicas dos grânulos de amido também podem ter sido significativas para o híbrido 2, assim como a conformação do grânulo na superfície, com a presença de poros ou canais, também desempenham papel importante na limitação ou favorecimento da difusão da enzima no interior do granulado (KANSOU et al., 2015).

4.5. Teor de sólidos solúveis finais

Após a fermentação de 72 horas, foram mensuradas novamente, a quantidade de açúcares simples que foram convertidos pelas leveduras, em meio anaeróbio, quanto maior o valor de °Brix, menor foi o consumo dos açúcares no meio, conseqüentemente, menor a produção em etanol (CERQUEIRA, 2013; MANOCHIO, 2014), conforme a Figura 14.

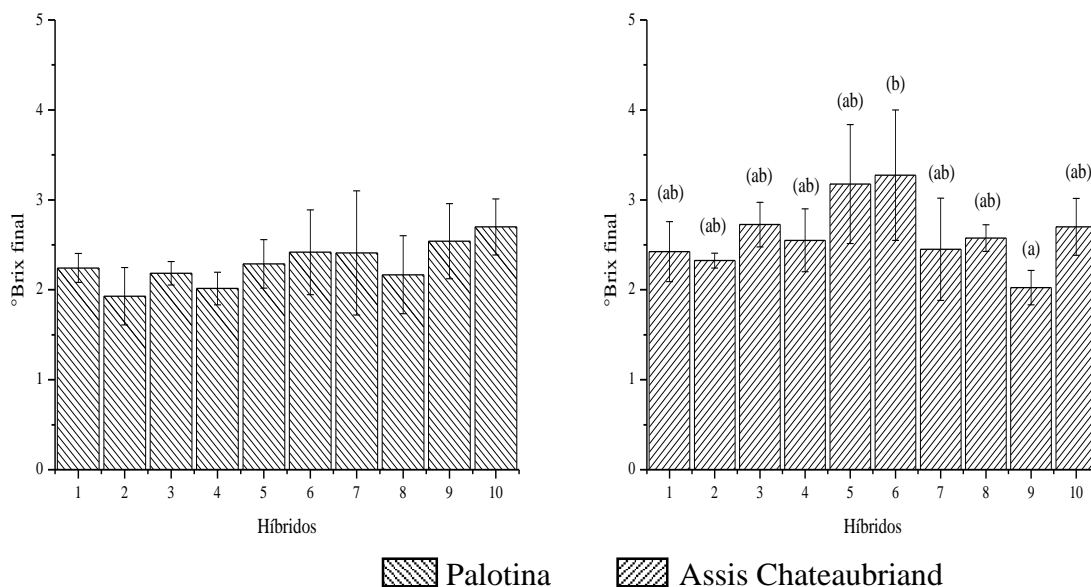


Figura 14: Teor de sólidos solúveis finais para os híbridos de Palotina (CV: 19,41; DMS:1,08) e Assis Chateaubriand (CV: 18,65; DMS: 1,18).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

Para o experimento localizado em Assis C., que obteve significância estatística, destacou-se o híbrido 9 (30F53 YH), por possuir menor °Brix após a fermentação, com 2,03 °Brix, e o híbrido com baixo consumo de açúcares, foi o 6 (Defender Viptera), com °Brix final de 3,28. No experimento de Palotina, o híbrido 2 (DKB315 VTPRO), obteve o menor Brix, com 1,93 °Brix, e o híbrido 10 (BG7330 H), com o maior Brix, de 2,70 °Brix.

No entanto, os valores dispostos nesta variável, apenas consideram o valor final obtido pós fermentação, e não o consumo entre o °Brix inicial e °Brix final de cada híbrido, pois quando nota-se essa distinção, outros híbridos despontam com maior e menor consumo de açúcares.

Em termos gerais, os híbridos que se sobressaíram quanto a relação de maior consumo de açúcares simples, foram: o híbrido 4, para Assis C., e o híbrido 9 para Palotina. Os que menos consumiram açúcares são: o híbrido 8, para Assis C., e o híbrido 3, para Palotina.

As distinções entre os campos experimentais estão de acordo com a quantidade de amido presente nas amostras, o amido que após atividade enzimática foi clivado para açúcares simples, sendo demonstrado em °Brix. A amostra 8 (Assis C.) obteve 62,9% em amido, e foram consumidos 6,6 °Brix, o híbrido 4 (Assis C.) teve 68,7% de amido, e o consumo de açúcares foi mais elevado, com 8,2 °Brix. O híbrido 3 (Palotina) consumiu 6 °Brix, e o percentual de

amido foi de 65,5%, e o híbrido 9 que se destacou no campo experimental de Palotina, obteve 67,9% de amido, sendo consumidos 7,3 °Brix.

4.6. Quantificação do teor de etanol no mosto

O teor de etanol no mosto foi avaliado via ebulliometria (Figura 15), em que foram obtidos os valores percentuais para Assis C., destacando-se o híbrido 4 (DKB290 VTPRO 3) com 7,00% de etanol no mosto, e o híbrido 8 (2b810 PW), com 5,38% de etanol no mosto. Para Palotina destacou-se o híbrido 9 (30F53 YH), com 5,97% em etanol, e o híbrido com menor produção, foi o 3 (DKB340 VTPRO 2), com 4,71%.

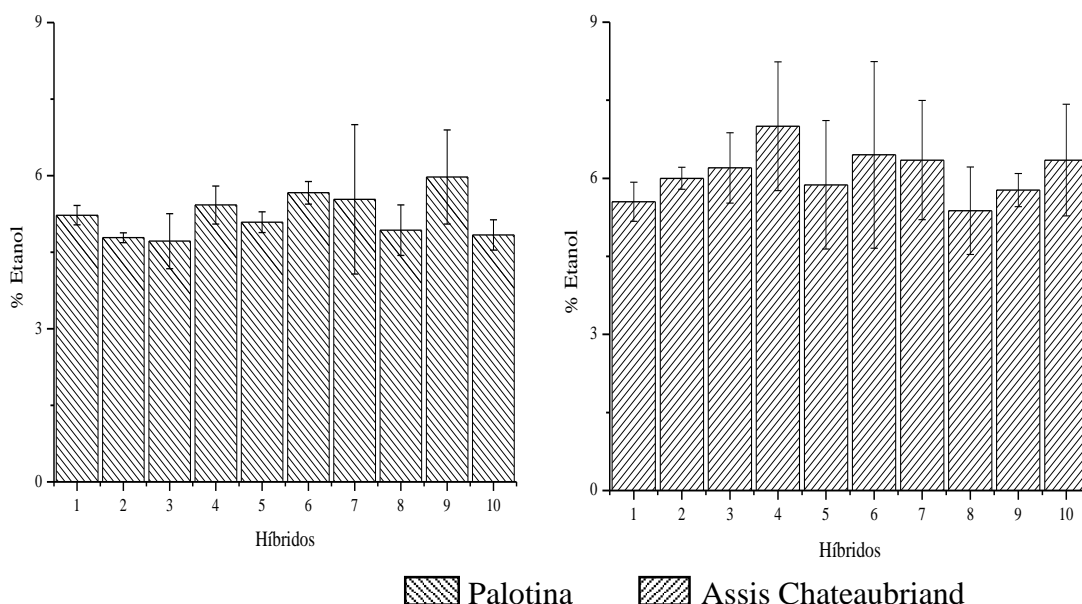


Figura 15: Porcentagem de etanol no mosto a partir das amostras de Palotina (CV: 13,43; DMS:1,70) e Assis Chateaubriand (CV: 18,70; DMS: 2,77).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

Os valores para etanol se correlacionam com os híbridos que tiveram o maior consumo de açúcares durante a fermentação, estando cerca de 99% correlacionado entre o consumo e a porcentagem de etanol no mosto para as amostras de Assis C. e cerca de 91% para as de Palotina.

De acordo com a Análise de Contraste realizada, os tipos de grãos (duro, semiduro e semidentado) não obtiveram significância nos resultados de porcentagem de etanol no mosto,

assim como nas outras variáveis, demonstrando que a qualidade do grão é mais relevante que a sua composição estrutural.

Quanto aos híbridos, apenas o híbrido 9 (30F53 YH) de Palotina, se destacou em termos de maior teor de amido/°Brix/etanol, gerando destaque, apesar de não ter tido a melhor produção em etanol (termos de porcentagem), foi a amostra que mais seguiu uma conformidade desde a disponibilização de compostos amiláceos até o produto final.

De acordo com Embrapa (2015), a quantidade de etanol presente no mosto fermentado, normalmente é entre 7% e 10%. A quantidade obtida nos experimentos ficaram, em média 5,7%, possivelmente devido a quantidade de inóculo, sendo insuficiente para a conversão dos açúcares disponíveis em etanol, desta forma, foi utilizado 3% (m/v) de *Saccharomyces cerevisiae* (BAPTISTA et al., 2013), sendo que industrialmente utiliza-se 10% de células de inóculo para a fermentação (DEMIATE et al., 1997; SOUZA, 2009).

A presença de contaminantes durante a fermentação pode resultar em prejuízo para o inóculo, sendo refletido no rendimento final e na produtividade. Quando ocorre a contaminação, a degradação da sacarose e a produção de ácidos é elevada, gerando intoxicação das leveduras (CARVALHO e MONTEIRO, 2011). O teor de etanol pode ter sido alterado com alguma contaminação previamente ao processo de fermentação, proveniente dos campos experimentais, e não ter sido contabilizada ao fim do procedimento.

4.7. Estimativa de Produtividade em Etanol ha⁻¹

Houveram maiores distinções entre os híbridos quanto a sua produtividade em relação de litros de etanol por hectare (Figura 16), destacando que os dois campos experimentais obtiveram significância estatística relevante.

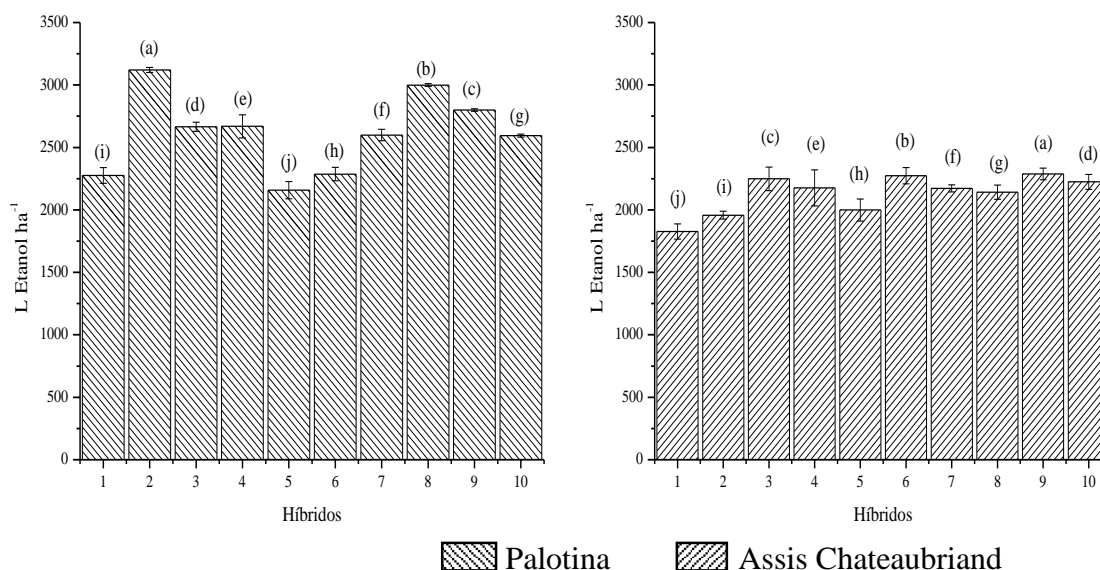


Figura 16: Estimativa de produtividade em litros de etanol ha⁻¹ para os híbridos de Palotina (CV: 0,00; DMS:0) e Assis Chateaubriand (CV: 0,00; DMS: 2,52⁻⁶).

* Os *upper whiskers* sobre os histogramas caracterizam os desvios padrões amostrais.

Para Assis Chateaubriand o híbrido 9 (30F53 YH), obteve uma produção média de 2.287,3 L etanol ha⁻¹, e o híbrido com menor conversão em etanol, foi o híbrido 1 (DKB290 “convencional”), com 1.826,8 L etanol ha⁻¹. Em Palotina destacou-se o híbrido com maior produção dos dois campos experimentais, o híbrido 2 (DKB315 VTPRO), com 3.120,6 L etanol ha⁻¹, e o híbrido que menos produziu para Palotina, foi o 5, com 2.158,3 L etanol ha⁻¹.

As produtividades em termos de L de etanol ha⁻¹, enfatizam que a relação de produtividade de biomassa Kg ha⁻¹ esteve correlacionada em mais de 99% para os dois campos experimentais em termos de litros de etanol ha⁻¹. Em comparação com a produtividade Kg ha⁻¹ e L etanol ha⁻¹, os mesmos híbridos obtiveram destaque, tanto os de maior produção, quanto os de menor. Incumbindo aos aspectos de quantidade de biomassa a importância para a produtividade do biocombustível.

Sendo relacionado com o que os autores Brown et al. (2014) e Mussato et al. (2010) afirmam que os aumentos da produtividade de milho em Kg ha⁻¹, permitem uma maior produção de etanol, enquanto que minimiza o uso de novas terras para a produção de milho.

O milho possui grande potencial de utilização para produção de etanol devido as suas características biológicas que podem colaborar substancialmente para as demandas de biocombustíveis, principalmente nos meses de entressafra da cana-de-açúcar.

Demonstrando que a importância da introdução dessa cultura já utilizada energeticamente em outros países poderá ofertar uma ampla resiliência no que tange aos estoques do combustível nas entressafras, minimizando as variações de preço do produto, assim como, gerar estabilidade no mercado de etanol.

Os resultados obtidos experimentalmente demonstram que o estudo de mais locais de implantação, assim como novos híbridos, diferentes épocas de semeadura, tecnologias e manejos, são indispensáveis para futuros trabalhos, para ressaltar híbridos específicos, de acordo com as características edafoclimáticas e de solo de cada região brasileira apta para a produção de milho destinada para o biocombustível.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo revela que os fatores que enaltecem o resultado final estão ligados a produtividade em grãos (kg ha^{-1}) e a qualidade dos grãos colhidos, e que as características produtivas desses híbridos podem divergir de acordo com cada ano safra decorrido. Sendo que quanto aos híbridos analisados, obteve-se destaque do híbrido 9 (30F53 YH – DuPont Pioneer) que despontou em todas as variáveis, mas em campos experimentais distintos, tendo boa adaptabilidade aos dois locais de implantação, sendo em um quanto a qualidade do grão e em outro quanto a produtividade por hectare. O híbrido que mais estimou produzir etanol por hectare foi o híbrido 2 (DKB315 VTPRO – Dekalb), que teve alta produtividade no campo, e que a qualidade do grão insignificativa não foi suficiente para gerar queda produtiva em etanol.

6. AGRADECIMENTOS

A empresa LNF[®] pela doação das enzimas alfa amilase e glucoamilase, assim como pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com alta tolerância a etanol, sendo específicas para a produção de etanol de milho. Ao Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR) pela concessão dos dados meteorológicos das cidades de Assis Chateaubriand e Palotina. A Cooperativa Agroindustrial C.Vale[®] pela disponibilização do campo experimental para inserção das parcelas de milho, assim como, a Fazenda Salomão de Assis Chateaubriand que acolheu o experimento em sua propriedade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. **Oferta e Demandas de Milho**. 2015. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Data de acesso: 25/05/2015.

ALBRECHT, L.P., MISSIO, R.F. **Manejo de Cultivos Transgênicos**. Palotina. Ed. Imprensa da UFPR. p. 139. 2013.

ALMEIDA, R.R. **Estudo Do Bagaço De Mandioca (*Manihot Esculenta C.*), Nativo E Tratado Com α –Amilase e Amiloglucosidase, Por Meio De Técnicas Termoanalíticas**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual De Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

ARMSTRONG, C.L., et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 550-557. 1995.

BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterization of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry**. v. 161, p. 270–278, Oct. 2014.

BARROS, C.P.; GIL-ALANA, L.A.; WANKE, P. Ethanol Consumption in Brazil: Empirical facts based on persistence, seasonality and breaks. **Biomass and Bioenergy**. v. 63, p. 313–320, 2014.

BAPTISTA, A.S., BELTRAME, H., SICA, P.M.S., MARABESI, A.O. **Produção De Etanol A Partir De Diferentes Variedades De Milho**. ESALQ/USP. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. 2013. Disponível em: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2965&numeroEdicao=21>. Acesso em: 25/05/2015.

BELLIDO, C., INFANTE, C., COCA, M., GONZÁLEZ-BENITO, G., LUCAS, S., GARCÍA-CUBERO, M.T. Efficient Acetone-Butanol-Ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. **Bioresource Technology**. v.8, p.190-332, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965949> Acesso em: 17/02/2016.

BELYEA, R.L.; RAUSCH, K.D.; TUMBLESON, M.E. Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. **Bioresource Technology**. v. 94, p. 293–298, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404000100>. Acesso em: 07/08/2015.

BERGAMASCHI, H., DALMAGO, G.A., COMIRAN, F., BERGONCI, J.I., MÜLLER, A.G., FRANÇA, S., SANTOS, A.O., RADIN, B., BIANCHI, C.A.M., PEREIRA, P.G. Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.243-249, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n2/a08v41n2.pdf>. Acesso em: 27/11/2015.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 2008.

BOTHAST, R.J.; SCHLICHER, M.A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.67, p. 19-25. 2005.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução ANP Nº 19, de 15.4.2015** - DOU 16.4.2015 - Republicada DOU 17.4.2015 - Republicada DOU 20.4.2015. Brasília, DF, 2015. Disponível em: http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/abril/ranp%2019%20-%202015.xml. Data de acesso: 01/06/2015.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis – SRP. **BOLETIM DO ETANOL Nº01/2014**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: www.anp.gov.br/?dw=70000. Data de acesso: 01/06/2015.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **AliceWeb**. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/consulta-ncm/consultar>. Acesso em: 27/05/2015.

BROWN, J.C., HANLEY, E., BERGTOLD, J., CALDAS, M., BARVE, V., PETERSON, D., CALLIHAN, R., GIBSON, J., GRAY, B., HENDRICKS, N., BRUNSELL, N., DOBBS, K., KASTENS, J., EARNHART, D. Ethanol plant location and intensification vs. extensification of corn cropping in Kansas. **Applied Geography.** vol.53, p.141–148, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143622814001167>. Acesso em: 01/12/2015.

CAI, C., ZHAO, L., HUANG, J., CHEN, Y., WEI, C. Morphology, structure and gelatinization properties of heterogeneous starch granules from high-amylose maize. **Carbohydrate Polymers.** v. 102, p. 606-614, Feb. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713012241>. Acesso em: 03/06/2015.

CAIRES, E. F., FONSECA, A. F., MENDES, J., CHUEIRI, W.A., MADRUGA, E.F. Produção de Milho, Trigo e Soja em Função das Alterações das Características Químicas do solo pela Aplicação de Calcário e Gesso na superfície, em Sistema de Plantio Direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p.315-327, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v23n2/16.pdf>. Acesso em: 27/11/2015.

CANTARELLI, V.S., FIALHO, E.T., SOUSA, R.V., FREITAS, R.T.F., LIMA, J.A.F. Composição química, vitreosidade e digestibilidade de diferentes híbridos de milho para suínos. **Ciência Agrotecnologia**, v.31, n.3, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000300036&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 24/11/2015.

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology.** v. 98, p. 2415–2457, Sep. 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407000156>. Acesso em: 03/06/2015.

CARVALHO, D.C.O., ALBINO, L.F.T., ROSTAGNO, H.S., OLIVEIRA, J.E., VARGAS JÚNIOR, 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, Mar./Apr. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982004000200012&script=sci_arttext. Acesso em: 03/06/2015.

CARVALHO, G.G., MONTEIRO, R.A.B. A. Influência do Teor de Acidez e da Contaminação Bacteriana do Mosto no Rendimento Fermentativo Industrial para Produção de Etanol. **FAZU em Revista**, n. 8, p. 47-54, 2011. Disponível em: <http://www.fazu.br/ojs/index.php/fazuemrevista/article/view/377/261>. Acesso em: 01/12/2015.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal. **Brazilian Journal of Food Technology**. p. 2-8. 2008. Disponível em: http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0001.pdf. Acesso em: 03/06/2015.

CERQUEIRA, D.P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcares**. Dissertação (Ciências). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2013. Disponível em: file:///C:/Users/CarolineTha%20C3%ADs/Downloads/Diogo_Patrini_Cerqueira.pdf. Acesso em: 26/11/2015.

CHAIWIVATRAKUL, S., TANG, L., DAILEY, M.N., NAKARMI, A.M. Automatic morphological trait characterization for corn plants via 3D holographic reconstruction. **Computers and Electronics in Agriculture**. v. 109, p. 109–123, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169914002191>. Acesso em: 03/06/2015.

CINELLI, B.A. **Produção de etanol a partir da Fermentação Simultânea à Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. 200f. 2012. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe_m/BernardoAlvesCinelli.pdf. Acesso em: 03/06/2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Superintendência: Regional de Mato. **Processo (simplificado) de produção de ETANOL de MILHO**. 8 f, 2012. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_28_12_11_19_007a-12_-_proc_simplificado_-_prod_etanol_-_milho-_mt.pdf. Acesso em: 07/08/2015.

CONDON, N.; KLEMICK, H.; WOLVERTON, A. Impacts of ethanol policy on corn prices: A review and meta-analysis of recent evidence. **Food Policy**. v. 51, p. 63–73, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919214002127>. Acesso em: 03/06/2015.

CORRADINI, E., LOTTI, C., MEDEIROS, E.S., CARVALHO, A.J.F., CURVELO, A.A.S., MATTOSO, L.H.C. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282005000400011. Acesso em: 03/06/2015.

COSTA, A.C., ATALA, D.I.P., MAUGERI, F., MACIEL, R. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 125–137, Oct. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201001881>. Acesso em: 03/06/2015.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Parecer Técnico sobre o Milho Transgênico**. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/1299.html>. Acesso em: 26/05/2015.

DEMIATE, I.M., LEONEL, M., DAMASCENO, S., MAEDA, K.C., LIMA, C.L.C., SARTORI, M.M., CEREDA, M.P. Avaliação da farinha de mandioca e do fubá de milho como substratos para a obtenção de bebida fermento-destilada. **Ciência de Tecnologia Alimentícia**, vol.17, n.2, 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611997000200004&script=sci_arttext&tlng=es. Acesso em: 01/12/2015.

DIAS, M.O.S., MACIEL FILHO, R., MANTELATTO, P.E., CAVALETT, O., ROSSELL, C.E.V., BONOMI, A., LEAL, M.R.E. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**. v.15, p.35-41, Jul. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211464515000147>. Acesso em: 03/06/2015.

DICKEY, L.C., PARRIS, N., CRAIG, J.C., KURANTZ, M.J. Separation of maize particles from alcohol extracts with minimal losses. **Industrial Crops and Products**. v.16, p.145–154, Sep. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669002000390?np=y>. Acesso em: 03/06/2015.

DUNWELL, J.M. Transgenic cereals: Current status and future prospects. **Journal of Cereal Science**. v. 59, p. 419–434, May 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521013001483>. Acesso em: 03/06/2015.

EIA. US Energy Information Administration. Independent Statistics and Analysis. **Corn ethanol yields continue to improve**. May 2015. Disponível em: <http://www.eia.gov/todayinenergy/detail.cfm?id=21212>. Data de acesso: 10/06/2015.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. **Regulamento concurso estadual de produtividade de milho ano 2000/2001**. Belo Horizonte. 2000. 11 p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Milho: Cultivares para a Safra 2013/2014**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>. Data de acesso: 25/05/2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Circular Técnica: Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do grão de Milho.** 2006. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf. Acesso em: 03/06/2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Circular Técnica: Fisiologia da Produção de Milho.** 2006. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19620/1/Circ_76.pdf. Acesso em: 24/11/2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Circular Técnica: Grãos Ardidos em Milho.** 2005. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ_66.pdf. Acesso em: 24/11/2015.

EMBRAPA. **Árvore do conhecimento: milho.** 2015. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vn102wx5eo0sawqe3djg2152.html>. Acesso em: 01/12/2015.

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional 2014: Ano base 2013 / Empresa de Pesquisa Energética,** Rio de Janeiro, RJ, 2014. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2014.pdf. Acesso em: 03/06/2015.

FERNANDES, J. **Influência do genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade.** 2014. Dissertação (Mestrado). Zootecnia. Universidade de São Paulo ESALQ. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde.../Juliana_Fernandes.pdf. Acesso em: 24/11/2015.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência agrotecnológica**, vol. 35 n.6, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542011000600001&script=sci_arttext. Acesso em: 08/12/2015.

FREDDI, O.S., CARVALHO, M.P., VERONESI JÚNIOR, V., CARVALHO, G.J. Produtividade do Milho Relacionada com a Resistência Mecânica à penetração do Solo sob preparo convencional. **Engenharia Agrícola**, v.26, n.1, p.113-121, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/eagri/v26n1/30102.pdf>. Acesso em: 27/11/2015.

FUGITA, T.P.L. **Desempenho de leveduras que Metabolizam Xilose para produção de Etanol em Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana.** Dissertação (Mestrado) - Microbiologia. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Jaboticabal, SP. 2010. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/m/83722.pdf>. Acesso em: 03/06/2015.

GASHTASBI, F.; AHMADIAN, G.; NOGHABI, K.A. New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 64–65, p. 17–23. Oct. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152412>. Acesso em: 03/06/2015.

GÍRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**. v.101, p. 4775–4800, Jul. 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410001744>. Acesso em: 03/06/2015.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**. v.32, n.3, p.582-587, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a04v32n3.pdf>. Acesso em: 03/06/2015.

GONÇALVES JÚNIOR, A.C., TRAUTMANN, R.R., MARENGONI, N.G., RIBEIRO, O.L., SANTOS, A.L. Produtividade do Milho em Resposta a Adubação com NPK e Zn em Argissolo Vermelho-Amarelo Eutrófico e Latossolo Vermelho Eutroférico. **Ciência Agrotecnológica**, v. 31, n. 4, p. 1231-1236, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/43.pdf>. Acesso em: 27/11/2015.

GU, J., XIN, Z., MENG, X., SUN, S., QIAO, Q., DENG, H. Studies on biodiesel production from DDGS-extracted corn oil at the catalysis of Novozym 435/super absorbent polymer. **Fuel**. v. 146, p. 33–40, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114012897>. Acesso em: 05/06/2015.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 1287–1294, Sep. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511312001845>. Acesso em: 06/06/2015.

İÇÖZ, E., TUĞRUL, K.M., SARAL, A., İÇÖZ, E. Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey. **Biomass and Bioenergy**. v. 33, p. 1–7, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953408001219>. Acesso em: 06/06/2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Edição. 1ª Edição digital. p. 1020. 2008.

ISAAA. **International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications**. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=111&Event=3272>. Acesso em: 27/05/2015.

ISHOLA, M.M.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M.J. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. **Biomass and Bioenergy**. v. 77, p. 192–199, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953415001075>. Acesso em: 27/05/2015.

JANSSEN, R., RUTZ, D., BRACONNIER, S., REDDY, B., RAO, S., SCHAFFERT, R. **Sweet Sorghum – An Alternative Energy Crop**. WIP Renewable Energies Sylvensteinstr, Munich, Germany. Disponível em:

http://www.researchgate.net/publication/229013045_SWEET_SORGHUMAN_ALTERNATIVE_ENERGY_CROP. Acesso em: 06/07/2015.

JONKER, J.G.G., HILST, F., JUNGINGER, H.M., CAVALETT, O., CHAGAS, M.F., FAAIJ, A.P.C. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**. v. 147, p. 593–610, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261915001269>. Acesso em: 03/07/2015.

JUNG, Y.H., KIM, I.J., KIM, H.K., KIM, K.H. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. **Bioresource Technology**. v. 132, p. 109–114, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412020093>. Acesso em: 27/05/2015.

KANSOU, K., BULÉON, A., GÉRARD, C., ROLLAND-SABATÉ, A. Multivariate model to characterise relations between maize mutant starches and hydrolysis kinetics. **Carbohydrate Polymers**. vol. 133, p. 497–506, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715006712>. Acesso em: 25/11/2015.

KHOO, H.H. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.46, p. 100–119, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136403211500115X>. Acesso em: 15/07/2015.

KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.E.; BERGER, L.L. Maize is a critically important source of food, feed, energy and forage in the USA. **Field Crops Research**. v. 153, p.5–11, Sep. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429012003784>. Acesso em: 15/07/2015.

KODAMA, S., NAKANISHI, H., THALAGALA, T.A., ISONO, N., HISAMATSU, M. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 115, p. 557–561, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23273910>. Acesso em: 06/07/2015.

KÖPPEN e GEIGER. Climate-data.org. **Classificações climáticas**. 2015. Disponível em: <http://pt.climate-data.org/location/43679/>. Acesso em: 07/08/2015.

KOSUGI, A., KONDO, A., UEDA, M., MURATA, Y., VAITHANOMSAT, P., THANAPASE, W., ARAI, T., MORI, Y. Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. **Renewable Energy**. v. 34, p. 1354–1358, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014810800339X>. Acesso em: 07/07/2015.

KRISHNAN, M.S., TAYLOR, F., DAVISON, B.H., NGHIEM, N.P. Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors. **Bioresource Technology**. v. 75, p. 99–105, 2000. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240000047X>. Acesso em: 07/07/2015.

KUMAR, N.M.; KARTHIKEYAN, S.; JAYARAMAN, G. Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 2, p. 38–44, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881811200134X>. Acesso em: 07/06/2015.

LÁZARO, R.L., COSTA, A.C.T., SILVA, K.F., SARTO, M.V.M., DUARTE JÚNIOR, J.B. Produtividade de milho cultivado em sucessão à adubação verde. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 10-17, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pat/v43n1/08.pdf>. Acesso em: 27/11/2015.

LEE, D.S., WI, S.G., LEE, S.J., LEE, Y.G., KIM, Y.S., BAE, H.J. Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. **Bioresource Technology**. v.158, p. 239–247, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414002107>. Acesso em: 05/07/2015.

LEE, J.H., YOU, S.G., KWEON, D.K., CHUNG, H.J., LIM, S.K. Dissolution behaviors of waxy maize amylopectin in aqueous-DMSO solutions containing NaCl and CaCl₂. **Food Hydrocolloids**. v. 35, p.115–121, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13001380>. Acesso em: 06/07/2015.

LEITE; R.C.C.; LEAL, M.L.R.V. O biocombustível no Brasil. **Novos estud. – CEBRAP**. n.78 São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-33002007000200003. Acesso em: 08/07/2015.

LÉVÊQUE, E., JANEČEK, S., HAYE, B., BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 3–14, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022999001428>. Acesso em: 08/07/2015.

LI, J., YOU, C., LYU, Z., ZHANG, C., CHEN, L., QI, Z. Fuel-based ethanol dehydration process directly extracted by gasoline additive. **Separation and Purification Technology**. v.149, p. 9–15, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586615300010>. Acesso em: 07/07/2015.

LIN, L., CAI, C., GILBERT, R.G., LI, E., WANG, J., WEI, C. Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. **Food Hydrocolloids**. vol 52, p. 359–368, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15300291>. Acesso em: 24/11/2015.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v.3. Ed. Edgar Blucher, Rio de Janeiro, 2001.

LIU, C.G., LIU, L.Y., LIN, Y.H., BAI, F.Y. Kinetic modeling for redox potential-controlled repeated batch ethanol fermentation using flocculating yeast. **Process Biochemistry**. v. 50, p. 1–7, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511314005443>. Acesso em: 05/07/2015.

LLANO-RESTREPO, M.Y.; MUÑOZ-MUÑOZ, M. Combined chemical and phase equilibrium for the hydration of ethylene to ethanol calculated by means of the Peng–Robinson–Stryjek–Vera equation of state and the Wong–Sandler mixing rules. **Fluid Phase Equilibria**. v. 307, p.45–57, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037838121100238X>. Acesso em: 05/07/2015.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**. v.16, n.2, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732003000200009&script=sci_arttext. Acesso em: 08/07/2015.

LORA, E.E.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis**. v. 2, 1200f., Ed. Interciência, 2012.

LUZ, J.M.Q., CAMILO, J.S., BARBIERI, V.H.B., RANGEL, R.M., OLIVEIRA, R.C. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em função de intervalos de colheita. **Horticultura Brasileira**. n. 32, p. 163-167, 2014.

MANOCHIO, C. **Produção de Bioetanol de Cana-de-Açúcar, Milho e Beterraba: uma Comparação dos Indicadores Tecnológicos, Ambientais e Econômicos**. Monografia (Engenharia Química). Universidade Federal de Alenas. 2014. Disponível em: http://www.unifal-mg.edu.br/engenhariaquimica/system/files/imce/TCC_2014_1/Carolina%20Manochio.pdf. Acesso em: 26/11/2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análises e Sementes**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf. Data de acesso: 03/06/2015.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**. v. 51, n.2, p.60-79, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpi/v51n2/v51n2a05>. Acesso em: 10/07/2015.

MAXWELL, C.; DAVISON, M. Using real option analysis to quantify ethanol policy impact on the firm's entry into and optimal operation of corn ethanol facilities. **Energy Economics**. v. 42, p. 140–151, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140988313002879>. Acesso em: 11/07/2015.

MCGREGOR, A.W.; BALLANCE, D.L. Hydrolysis of Large and Small starch granules from normal and Barley cultivars by alfa-amylases from Barley Malt. **Cereal Chem**. v. 57, n.6, p. 397-402, 1980. Disponível em:

http://www.aacnet.org/publications/cc/backissues/1980/documents/chem57_397.pdf. Acesso em: 04/07/2015.

MILANEZ, A.Y., NYKO, D., VALENTE, M.S., XAVIER, C.E.O., KULAY, L.A., DONKE, C.G., MATSUURA, M.I.S.F., RAMOS, N.P., MORANDI, M.A.B., BONOMI, A., CAPITANI, D.H.D., CHAGAS, M.F., CAVALETT, O., GOUVEIA, V.R.L. A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. **Revista do BNDES**, n. 41, p. 147-207, Rio de Janeiro, jun. 2014. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Tipo/Revista_do_BNDES/201406_04.html. Acesso em: 15/07/2015.

MILES, M.J., MORRIS, V.J., ORFORD, P.D., RING, S.G. The Roles Of Amylose And Amylopectin In The Gelation And Retrogradation Of Starch. **Carbohydrate Research**. v.135, p. 271-281, 1985. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862150090778X>. Acesso em: 16/07/2015.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n.3, 1959.

MONTEIRO, A.F.S. **Avaliação das potencialidades de produção de bioetanol em Portugal**. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 118 f. 2011 Disponível em <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/61489/1/000148669.pdf>. Acesso em: 07/08/2015. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 19/07/2015.

MOON, J., LIU, Z.L., MA, M., SLININGER, P.J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 2, p. 247-254, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113000297>. Acesso em: 13/07/2015.

MORAIS, M.R. **Produção de etanol em meio sintético com recuperação de fermento entre bateladas sucessivas**. Dissertação (Mestrado) - Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/handle/11449/88030>. Acesso em: 17/07/2015.

MORRIS, M.; HILL, A. Ethanol Opportunities and Questions. **NCAT Energy Specialists**. p. 1-16, 2006. Disponível em: <http://mainerural.webfactional.com/energy/fieldguide/ethanol.pdf>. Data de acesso: 10/06/2015.

MURTHY, G.S., SALL, E.D., METZ, S.G., FOSTER, G., SINGH, V. Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. **Industrial Crops and Products**. v. 29, p. 67-72, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669008000757>. Acesso em: 11/06/2015.

MUSSATTO, S.L., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P.M.R., SILVA, J.P.A., CARNEIRO, L.M., ROBERTO, I.C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, vol. 28, p. 817–830, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000947>. Acesso em: 01/12/2015.

NAIDU, K., SINGH, V., JOHNSTON, D.B., RAUSCH, K.D., TUMBLESON, M.E. Effects of Ground Corn Particle Size on Ethanol Yield and Thin Stillage Soluble Solids. **Cereal Chemistry**. v.84, n.1, p. 6-9. 2007. Disponível em: http://www.aacnet.org/publications/cc/2007/January/Pages/84_1_6.aspx. Acesso em: 10/06/2015.

NUNES, R.V., POZZA, P.C., POTENÇA, A., NUNES, C.G.V., POZZA, M.S.S., LORENÇON, L., EYNG, C., NAVARINE, F.C. Composição química e valores energéticos do milho e da silagem de grãos úmidos de milho para aves. **Rev. Bras. Saúde Prod.** v.9, n.1, p. 82-90, 2008. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/892>. Acesso em: 13/06/2015.

OHARA, S., KATO, T., FUKUSHIMA, Y., SAKODA, A. Selective ethanol production from reducing sugars in a saccharide mixture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 115, p. 540–543, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312004616>. Acesso em: 13/06/2015.

OMIDO, C.R., OLIVEIRA, S.L., LIMA, J.L., MAGALHÃES, J.F., CARVALHO, A.A., KITANO, C. Water content in hydrated ethanol fuel measured by a photothermal chamber with a transparent transducer. **Fuel**. v. 157, p. 122–125, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236115004433>. Acesso em: 12/06/2015.

OLSZEWSKI, P. Heat recovery investigation from dryer–thermal oxidizer system in corn-ethanol plants. **Applied Thermal Engineering**. v.81, p. 210–222, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359431115001416>. Acesso em: 13/06/2015.

PARAMERA, E.I.; KONTELES, S.J.; KARATHANOS, V.T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**. v. 125, p. 913–922, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610011702>. Acesso em: 12/06/2015.

PARK, K.H.; ROBYT, J.F.; CHOI, Y.D. Progress in Biotechnology: **Enzymes for Carbohydrate Engineering**. v. 12, p. 1-215. 1996.

PERSSON, T., GARCIA, A.G., PAZ, J., JONES, J., HOOGENBOOM, G. Maize ethanol feedstock production and net energy value as affected by climate variability and crop management practices. **Agricultural Systems**. v. 100, p. 11–21, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308521X08001315>. Acesso em: 20/06/2015.

PIOVESAN, V. **Milhos com diferentes texturas de endosperma e adição de alfa-amilase na ração de leitões**. 2009. Dissertação (Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon. Disponível em: http://tede.unioeste.br/tede/tde_arquivos/8/TDE-2010-08-17T163708Z-438/Publico/Vanessa%20Piovesan.pdf. Acesso em: 24/11/2015.

PISHGAR-KOMLEH, S.H., KEYHANI, A., MOSTOFI-SARKARI, M., JAFARI, A. Energy and economic analysis of different seed corn harvesting systems in Iran. **Energy**. v. 43, p. 469–476. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544212002319>. Acesso em: 15/06/2015.

PIETRZAK, W.; KAWA-RYGIELSKA, J. Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. **Fuel**. v. 134, p. 250–256. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114005432>. Acesso em: 24/06/2015.

PIMENTEL GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística Aplicada a Experimentos Agrônomicos e Florestais**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz. FEALQ. Piracicaba, 2002. 307p.

PINTO, A.A., BICALHO, I.C., MOGNON, J.L., DUARTE, C.R., ATAÍDE, C.H. Separation of *Saccharomyces cerevisiae* from alcoholic fermentation broth by two commercial hydrocyclones. **Separation and Purification Technology**. v. 120, p. 69–77. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586613005406>. Acesso: 15/06/2015.

REIS, L.B., FADIGAS, E.A.A.; CARVALHO, C.E. **Energia, recursos naturais e prática do desenvolvimento sustentável**. Ed. Manole Ltda. 1ª edição. Barueri-SP. 415f. 2005.

RESA, P., ELVIRA, L. ESPINOSA, F.M., GÓMEZ-ULLATEM Y. Ultrasonic velocity in water–ethanol–sucrose mixtures during alcoholic fermentation. **Ultrasonics**. v. 43, p. 247–252. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567201>. Acesso em: 23/06/2015.

RFA. Renewable Fuels Association. **The Role Of The U.S. Ethanol Industry In Food And Feed Production**. 2011. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/page/-/RFA%20White%20Paper-%20Fueling%20a%20Nation,%20Feeding%20a%20World.pdf?nocdn=1>. Data de acesso: 09/06/2015.

ROMANÍ, A., PEREIRA, F., JOHANSSON, B., DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**. v. 179, p.150–158. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536512>. Acesso em: 25/06/2015.

SAHA, B.C., ITEN, L.B., COTTA, M.A., WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**. v.40, p. 3693–3700, 2005. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305002308>. Acesso em: 07/08/2015.

SALLA, D.A. **Análise Energética de Sistemas de Produção de Etanol de Mandioca, Cana-de-açúcar e Milho**. Tese (doutorado) - Energia na Agricultura. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP. 2008.

SALLA, D.A., FURLANETO, F.P.B., CABELLO, C., KANTHACK, R.A.D. Estudo energético da produção de biocombustível a partir do milho. **Ciência Rural**, v.40, n.9, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782010005000142&script=sci_arttext. Acesso em: 26/06/2015.

SAKIHAMA, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 119, p. 297–302. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25282639>. Acesso em: 15/06/2015.

SEN, S.K., DORA, T.K., BANDYOPADHYAY, B., MOHAPATRA, P.K.D., RAUT, S. Thermostable alpha-amylase enzyme production from hot spring isolates *Alcaligenes faecalis* SSB17 – Statistical optimization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 218–226. 2014. Disponível: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818114000619>. Acesso em: 02/06/2015.

SFU – SIMON FRASER UNIVERSITY. **The Paetzel Lab Structure Gallery**. Disponível em: <http://www.sfu.ca/~mpaetzel/Gallery.html>. Data de acesso: 25/05/2015.

SILVA, W.A.; CAMPOS, V.R. Etanol (CAS No 64-17-5). **Revista Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos**. v. 5, n.5, 2013. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/issue/view/32>. Acesso em: 24/06/2015.

SILVA, R.M., FERREIRA, G.F., SHIRAI, M.A., HAAS, A., SCHERER, M.L., FRANCO, C.M.L., DEMIATE, I.M. Características físico-químicas de amidos modificados com permanganato de potássio/ácido láctico e hipoclorito de sódio/ácido láctico. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v.28, n.1, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000100011. Acesso em: 06/07/2015.

SINGH, R., SHUKLA, A., TIWARI, S., SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 32, p. 713–728. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114000628>. Acesso em: 20/06/2015.

SOBOKAN, G.; GLAVIK, P. Optimization of ethanol fermentation process design. **Applied Thermal Engineering**. v. 20, p. 529–543. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359431199000423>. Acesso em: 14/06/2015.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo. 155 f. 2009.

TALEKAR, S., PANDHARBALE, A., LADOLE, M., NADAR, S., MULLA, M., JAPHALEKAR, K., PATTANKUDE, K., ARAGE, D. Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): A tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. **Bioresource Technology**. v. 147, p. 269–275. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999260>. Acesso em: 20/06/2015.

TORABIZADEH, H.; TAVAKOLI, M.; SAFARI, M. Immobilization of thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v 108, p. 13–20. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714001787>. Acesso em: 23/06/2015.

USDA. United States Department of Agriculture. **Feed Outlook**. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/FDS/FDS-05-14-2015.pdf>. Data de acesso: 27/05/2015.

USDA. United States Department of Agriculture. **The energy balance of Corn Ethanol: An Update**. 2002. Disponível em: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/34075/1/ae020814.pdf>. Data de acesso: 10/06/2015

VIEIRA NETO, J. **Milho duro e dentado na forma de grãos secos e silagem de grãos úmidos para leitões dos 7 aos 15 Kg**. 2006. Dissertação (Zootecnia). Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2782/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Milho%20duro%20e%20dentado%20na%20forma%20de%20gr%C3%A3os%20secos%20e%20silagem%20de%20gr%C3%A3os%20C3%BAmidos%20para%20leit%C3%B5es%20dos%207%20aos%2015Kg.pdf. Acesso em: 24/11/2015.

WALTER, M.; SILVA, L.P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**. v.35, n.4, p.974-980, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a41v35n4>. Acesso em: 03/06/2015.

WANG, C., MAS, A., ESTEVE-ZARZOSO, B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 206, p. 67–74. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956738>. Acesso em: 26/06/2015.

WARREN, F.J., ROYALL, P.G., GAISFORD, S., BUTTERWORTH, P.J., ELLIS, P.R. Binding interactions of α -amylase with starch granules: The influence of supramolecular structure and surface area. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, p.1038–1047. 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711004425>. Acesso em: 06/06/2015.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; CHANG, Y.K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000400008&script=sci_arttext. Acesso em: 04/07/2015.

WESCHENFELDER, S.C. **Aplicação do custeio baseado em atividades na determinação do custo de produção de etanol a partir do sorgo sacarino em pequena unidade de produção.** Dissertação (mestrado) – Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2011. Disponível em: http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_arquivos/12/TDE-2012-10-30T120548Z-3792/Publico/WESCHENFELDER,%20SUSANE%20CRISTINA.pdf. Acesso em: 03/07/2015.

WIDODO, Y.; WAHYUNINGSIH, S.; UEDA, A. Sweet Potato Production for Bio-ethanol and Food Related Industry in Indonesia: Challenges for Sustainability. **Procedia Chemistry.** v.14, p. 493–500, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619615000674>. Acesso em: 07/08/2015.

WOLT, J.D.; KARAMAN, S. Estimated environmental loads of alpha-amylase from transgenic high-amylase maize. **Biomass and Bioenergy.** v. 31, p. 831–835. 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953407000761>. Acesso em: 15/06/2015

WOOD, C.; ROSENTRATER, K.A.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Techno-economic modeling of a corn based ethanol plant in 2011/2012. **Industrial Crops and Products.** v. 56, p. 145–155. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014001320>. Acesso em: 08/06/2015.

YAMADA, R.; BITO, Y.; ADACHI, T.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated α -amylase and glucoamylase genes. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 44, p. 344–349. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022909000180>. Acesso em: 03/07/2015.

YAMAOKA, C.; KURITA, O.; KUBO, T. Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. **Microbiological Research.** v. 169, p. 907–914. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314000627>. Acesso em: 13/06/2015.

YU, K.O.; JUNG, J.; RAMZI, A.B.; CHOE, S.H.; KIM, S.W.; PARK, C.; HAN, S.O. Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 51, p. 237–243. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883559>. Acesso em: 08/06/2015.

ZHANG, P.; CHEN, C.; SHEN, Y.; DING, T.; MA, D.; HUA, Z.; SUN, D. Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**. v.128, p. 835–838. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412017099>. Acesso em: 03/06/2015.

ZHANG, N.; GREEN, V.S.; GE, X.; SAVARY, B.J.; XU, J. Ethanol fermentation of energy beets by self-flocculating and non-flocculating yeasts. **Bioresource Technology**. v.155, p. 189–197. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413019214>. Acesso em: 09/06/2015.

ZHU, S.; HUANG, W.; HUANG, G.; WANG, K.; CHEN, Q.; WU, Y. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. **Applied Energy**. v. 154, p. 190–196, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261915006017>. Acesso em: 07/08/2015.

ANEXO 1



Experimento instalado na Cooperativa C.vale.

ANEXO 2

Abaixo se encontram as Tabelas de Variância da ANOVA para o experimento localizado no campo experimental da C.VALE (Palotina).

Sendo:

FV: Fator de variação

GL: Grau de Liberdade

SQ: Soma dos Quadrados

QM: Quadrado Médio

Fc: Fator da Estatística F

Pr>Fc: Probabilidade maior que o Fc

CV (%): Coeficiente de Variação Percentual

DMS: Diferença Mínima Significativa

a) Tabela de Análise de Variância: Teor de umidade dos Grãos de milho

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	381,57	42,39	4,54	0,00
Bloco	3	2,46	0,82	0,18	0,96
Erro	27	251,97	9,33		
Total Corrigido	39	636,01			
CV (%)			11,39		
Média Geral			26,81		
DMS			7,43		

b) Tabela de Análise de Variância: Estimativa de produtividade de biomassa (Kg ha⁻¹)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	36521573,58	405752,62	59,11	0,00
Bloco	3	72432,75	24144,25	0,35	0,78
Erro	27	1853544,41	68649,79		
Total Corrigido	39	38447550,75			
CV (%)			3,10		
Média Geral			8457,17		
DMS			637,39		

c) Tabela de Análise de Variância: Teor de amido

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	247,42	27,49	293,29	0,00
Bloco	3	0,06	0,02	0,23	0,86
Erro	27	2,53	0,09		
Total Corrigido	39	250,01			
CV (%)			0,46		
Média Geral			65,87		
DMS			0,74		

d) Tabela de Análise de Variância: Teor de sólidos solúveis iniciais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	10,93	1,21	1,30	0,28
Bloco	3	4,13	1,37	1,47	0,24
Erro	27	25,19	0,93		
Total Corrigido	39	40,26			
CV (%)			10,97		
Média Geral			8,80		
DMS			2,34		

e) Tabela de Análise de Variância: Teor de sólidos solúveis finais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	1,98	0,22	1,11	0,38
Bloco	3	0,30	0,10	0,50	0,67
Erro	27	5,32	0,19		
Total Corrigido	39	7,61			
CV (%)			19,41		
Média Geral			2,28		
DMS			1,08		

f) Tabela de Análise de Variância: Quantificação do teor de etanol do mosto fermentado

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------------

Tratamentos	9	6,38	0,70	1,44	0,21
Bloco	3	2,31	0,77	1,56	
Erro	27	13,26	0,49		
Total Corrigido	39	21,95			
CV (%)			13,43		
Média Geral			5,21		
DMS			1,70		

g) Tabela de Análise de Variância: Estimativa de Produtividade em Etanol ha⁻¹

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	3493890,17	388210,01	1,0 ⁰⁰⁰⁹	0,00
Bloco	3	0,00		1,0 ⁰⁰⁰⁹	0,00
Erro	27	0,00			
Total Corrigido	39	3493890,17			
CV (%)			0,00		
Média Geral			2616,04		
DMS			0		

ANEXO 3

Abaixo localizam-se os dados das Tabelas de Análise de Variância ANOVA para o campo experimental de Assis Chateaubriand.

Sendo:

FV: Fator de variação

GL: Grau de Liberdade

SQ: Soma dos Quadrados

QM: Quadrado Médio

Fc: Fator da Estatística F

Pr>Fc: Probabilidade maior que o Fc

CV (%): Coeficiente de Variação Percentual

DMS: Diferença Mínima Significativa

a) Tabela de Análise de Variância: Teor de umidade dos Grãos de milho

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	241,90	26,87	1,0 ⁰⁰⁰⁹	0,00
Bloco	3	0,00		1,0 ⁰⁰⁰⁹	0,00
Erro	27	0,00			
Total Corrigido	39	241,90			
CV (%)			0,00		
Média Geral			65,82		
DMS			0		

b) Tabela de Análise de Variância: Estimativa de produtividade de biomassa (Kg ha⁻¹)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	8826114,09	980679,34	12,32	0,00
Bloco	3	205967,64	68655,88	0,86	0,47
Erro	27	2147570,17	79539,63		
Total Corrigido	39	11179651,90			
CV (%)			4,10		
Média Geral			6.886,40		
DMS			686,09		

c) Tabela de Análise de Variância: Teor de amido

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	208,36	23,15	144,08	0,00
Bloco	3	0,70	0,23	1,47	0,24
Erro	27	4,33	0,16		
Total Corrigido	39	213,41			
CV (%)			0,63		
Média Geral			63,65		
DMS			0,97		

d) Tabela de Análise de Variância: Teor de sólidos solúveis iniciais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	16,64	1,84	0,93	0,51
Bloco	3	9,41	3,13	1,58	0,21
Erro	27	53,53	1,98		
Total Corrigido	39	79,59			
CV (%)			14,07		
Média Geral			10,00		
DMS			3,42		

e) Tabela de Análise de Variância: Teor de sólidos solúveis finais

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	5,07	0,56	2,35	0,04
Bloco	3	0,53	0,17	0,74	0,53
Erro	27	6,45	0,23		
Total Corrigido	39	12,06			
CV (%)			18,65		
Média Geral			2,62		
DMS			1,18		

f) Tabela de Análise de Variância: Quantificação do teor de etanol do mosto fermentado

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	8,24	0,91	0,70	0,69
Bloco	3	5,75	1,91	1,47	0,24
Erro	27	35,04	1,29		
Total Corrigido	39	49,04			
CV (%)			18,70		
Média Geral			6,09		
DMS			2,77		

g) Tabela de Análise de Variância: Estimativa de Produtividade em Etanol ha⁻¹

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	9	845034,14	93892,68	8,7 ⁰⁰¹⁶	0,00
Bloco	3	0,00	0,00	0,00	1,00
Erro	27	2,91 ⁻⁰⁰¹¹	1,07 ⁰⁰¹²		
Total Corrigido	39	845034,14			
CV (%)			0,00		
Média Geral			2130,79		
DMS			2,52 ⁻⁶		