

FELIPE CARLOS SPNESKI SPEROTTO

**ABORDAGEM MULTIPROCESSUAL E CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS SECOS DE
DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) DE MILHO**

Botucatu

2017

FELIPE CARLOS SPNESKI SPEROTTO

**ABORDAGEM MULTIPROCESSUAL E CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS SECOS DE
DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) DE MILHO**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

Orientador: Marco Antonio Martin
Biaggioni

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S749a Sperotto, Felipe Carlos Spneski, 1988-
Abordagem multiprocessual e caracterização dos grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de milho / Felipe Carlos Spneski Sperotto. - Botucatu : [s.n.], 2017
89 p. : fots. color., grafs. color., ils., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Marco Antonio Martin Biaggioni
Inclui bibliografia

1. Milho. 2. Resíduos agrícolas. 3. Biocombustíveis. 4. Proteômica. 5. Lipídios. I. Biaggioni, Marco Antonio Martin. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ABORDAGEM MULTIPROCESSUAL E CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS (DDGS) DO MILHO"

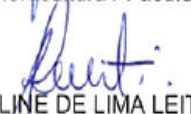
AUTOR: FELIPE CARLOS SPNESKI SPEROTTO

ORIENTADOR: MARCO ANTONIO MARTIN BIAGGIONI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCO ANTONIO MARTIN BIAGGIONI
Depto de Engenharia Rural / UNESP - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu


Prof. Dr. ROGÉRIO LOPES VIEITES
Depto de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônômica - UNESP


Prof. Dr. ALINE DE LIMA LEITE
Depto de Química e Bioquímica / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP


Profa. Dra. SILVIA REGINA LUCAS DE SOUZA
Dep de Engenharia Rural / Faculdade de Ciências Agrônômica - UNESP


Profa. Dra. GISELA FERREIRA
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu

Botucatu, 13 de março de 2017.

RESUMO

A busca por combustíveis menos poluentes aumenta o interesse pelo etanol. No Brasil, a possibilidade da produção de etanol de milho na entressafra da cana-de-açúcar apresenta-se como uma alternativa promissora. Após a produção de etanol de milho, gera-se um resíduo conhecido como ``distiller's dried grains with solubles (DDGS)`` ou grãos secos de destilaria com solúveis, usado como fonte de energia revertida em alimentação animal. O principal objetivo desta pesquisa foi caracterizar e agregar valor ao DDGS de milho, permitindo que seu uso seja expandido para além da alimentação animal. Para tanto, foram utilizadas técnicas de processamento, análises de caracterização química e bioquímica. O delineamento foi inteiramente casualizado para as análises de lipídeos e açúcares. Os resultados indicaram que o DDGS de milho apresentou em sua constituição de minerais altas concentrações de enxofre, cobre e cobalto o que indica a necessidade de se caracterizar o produto antes de disponibiliza-lo como ração. O uso da técnica proteômica possibilitou levantar 191 proteínas presentes no DDGS. A adição de etanol como co-solvente de extração aumentou o volume de óleo extraído via CO₂ supercrítico, sendo que a taxa de 10% de adição de etanol obteve o melhor rendimento 9,3% em 180 minutos. A adição de etanol como co-solvente de extração não foi significativa para recuperação de compostos lipídicos como tocols e fitosteróis do óleo de DDGS. O uso da auto-hidrólise para extração de carboidratos do DDGS de milho possibilitou extrair 7,31 g.mL⁻¹ de líquido hidrolisado de DDGS à 180 °C e 20% de sólido. Extrações com temperaturas diferentes de 180 °C resultaram nas maiores médias de furfural, indicando maior degradação das moléculas de açúcares durante o tratamento térmico. O uso das técnicas de extração de óleo e carboidratos totais mostraram que o DDGS possui compostos capazes de serem extraídos e assim elevar sua função além da ração animal.

Palavras Chave: ZEA mays, resíduos agroindustriais, fluído supercrítico, técnica hidrotérmica, proteômica, lipídios menores.

ABSTRACT

The search for cleaner fuels increases interest in ethanol. In Brazil, the possibility of producing corn ethanol in the sugarcane harvest season is a promising alternative. After the production of corn ethanol, a residue known as "distiller's dried grains with solubles (DDGS)" is used as a source of energy reversed in animal feed. The main objective of this research was to characterize and add value to DDGS, allowing its use to be expanded beyond animal feed. For this purpose, processing techniques, chemical characterization and biochemical analyzes were used. The design was completely randomized for lipids and sugars analyzes. The results indicated that the DDGS of corn presented high concentrations of sulfur, copper and cobalt in its constitution, indicating the need to characterize the product before making it available as feed. The use of the proteomic technique allowed to raise 191 proteins present in DDGS. The addition of ethanol as extraction co-solvent increased the volume of oil extracted via supercritical CO₂, with the ethanol addition rate of 10% obtaining the best yield of 9.3% in 180 minutes. The addition of ethanol as extraction co-solvent was not significant for recovery of lipid compounds such as tocopherols and phytosterols from DDGS oil. The use of autohydrolysis to extract carbohydrates from corn DDGS made it possible to extract 7.31 g.mL⁻¹ of DDGS hydrolyzed liquid at 180 °C and 20% solid. Extractions with temperatures different from 180 °C resulted in the higher averages of furfural, indicating greater degradation of the sugar molecules during the heat treatment. The use of oil and total carbohydrates extraction techniques showed that DDGS has compounds capable of being extracted and thus elevate its function beyond animal feed.

Keywords: ZEA may, agro-industrial wastes, supercritical fluid, hydrothermal technique, proteomics, minor lipids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVO.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.1.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	Energia renovável.....	14
3.3	Estrutura e produção do grão de milho no Brasil	18
3.3	Produção de etanol de milho	18
3.4	Grãos secos de destilaria com solúveis (<i>Distiller's dried grains with solubles</i> (DDGS))	20
3.4.1	Composição química e bioquímica do DDGS	22
3.5	Composição lipídica do DDGS	27
3.6	Açúcares totais do DDGS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Caracterização química e bioquímica do DDGS de milho.....	32
4.1.2	Análise de minerais do DDGS	33
4.1.2.1	Preparo das amostras	33
4.1.2.2	Determinações de Ca, Cu, Co e Se	34
4.1.2.3	Determinação de P	34
4.2	Extração de óleo via dióxido de carbono supercrítico	36
4.2.1	Análise de lipídios menores.....	38
4.2.1.1	Teor de tocomanol	38
4.2.1.2	Teor de fitoesterol.....	38
4.3	Extração de açúcares do DDGS via auto-hidrólise	39
4.3.1	Carboidratos Totais	42
4.3.2	Concentração de ácido ferúlico livre e esterificado	42
4.4	Análise estatística	43
4.4.1	Análise Centesimal	43
4.4.2	Análise de Minerais.....	43
4.4.3	Extração via dióxido de carbono supercrítico	44
4.4.4	Extração de carboidratos totais via auto-hidrólise	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.2	Análise de minerais.....	47
5.4	Extração de óleo via dióxido de carbono supercrítico SC-CO ₂	49
5.4.1	Perfil lipídico do óleo de DDGS de milho extraído via CO ₂ supercrítico e via soxhlet	58
5.4.1.1	Teor de tocomanol (tocoferol + tocotrienol) do óleo de DDGS de milho	59
5.4.1.2	Teor de fitosterol do óleo de DDGS de milho	59
5.5	Extração de carboidratos totais via auto-hidrólise	65
5.5.1	Concentração de ácido ferúlico livre e esterificado	69
6	CONCLUSÕES.....	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
8	REFERÊNCIAS	75
9	APÊNDICE.....	81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol. Sua produção a partir da cana-de-açúcar é de, aproximadamente, 30 bilhões de litros por ano segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2015). Recentemente, devido ao avanço da tecnologia do setor associado com a busca por novas fontes renováveis de matéria prima, o interesse pelo etanol de grãos traduz o início de uma nova disponibilidade de biocombustível no Brasil. Segundo dados da Companhia nacional de abastecimento - (CONAB), (2016), o Brasil supera suas safras de milho a cada ano sendo esperadas safras recordes até o ano de 2020. Estes números podem ser traduzidos em maior oferta de milho no mercado e aumento dos estoques do grão que já apresentam-se em grande escala.

O processo de produção de etanol a partir do milho gera um coproduto chamado grãos secos de destilaria ou em inglês conhecido como dried distillers grains (DDG), que contém resíduos de grãos após a fermentação. Para se obter o dried distillers grains with solubles (DDGS) adiciona-se ao DDG (grãos secos de destilaria) os solúveis recuperados durante o processo de centrifugação do mosto de milho, logo em seguida a mistura de DDG mais os solúveis recuperados passam pelo processo de secagem a alta temperatura, e o produto passa a ser chamado de grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS).

A partir de cada tonelada de milho processado, cerca de 480 Kg de DDGS são produzidos. Uma vez que este produto apresenta 10% a 12% de umidade, o mesmo possui uma vida de prateleira para além de oito meses se bem acondicionado, sendo esse um dos pontos positivos de sua comercialização em áreas distantes da indústria de produção de etanol.

Não se tem atualmente estimativas da capacidade de produção total de etanol de milho no Brasil, porém sabe-se que estados como o Mato-Grosso, Mato-Grosso do Sul e Goiás já produzem e/ou investem nas chamadas usinas “flex”, capazes de extrair etanol a partir da cana-de-açúcar e do milho. A produção dos grãos secos de destilaria com solúveis ou distiller’s dried grains with solubles (DDGS) incrementa a receita das usinas

com a possibilidade da sua comercialização para produtores de bovinos de corte e leite, granjas de aves e suínos.

Nos Estados Unidos da América, anualmente, cerca de 40 mil toneladas de DDGS são produzidos, com mais de 30 mil toneladas sendo direcionados para o mercado interno (USDA, 2012).

Atualmente, o DDGS é usado principalmente como fonte de energia na alimentação animal. Seu custo relativamente inferior em comparação com outras fontes de energia e proteína, como o farelo de soja, levou ao aumento da inclusão deste produto na alimentação dos animais (ERICKSON; KLOPFENSTEIN; WATSON, 2012).

Devido o uso do DDGS ser destinado em grande parte para alimentação animal, os estudos sobre o produto têm-se centrado na sua composição centesimal, composição de aminoácidos, teores de minerais e relação consumo versus ganho de peso dos animais. Uma vez que, a extração de etanol da cana-de-açúcar é mais barata e tem maior produtividade, é preciso consolidar a indústria do etanol de milho e assim identificar e desenvolver usos alternativos, como a oferta de DDGS, buscando explorar seu conteúdo, incluindo proteína, óleo e ácidos fenólicos, seguindo a linha de busca por compostos bioativos.

Sendo assim, faz-se necessário o levantamento de informações para impulsionar o uso deste coproduto no Brasil e, conseqüentemente, fornecer meios para as agroindústrias obterem uma maior rentabilidade e sustentabilidade da matéria prima e seus coprodutos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar e agregar valor ao DDGS, um coproduto da indústria de biocombustíveis, permitindo que seu uso seja expandido para além da alimentação animal, podendo chegar à indústria farmacêutica e alimentícia. Para atingir este objetivo, alguns objetivos específicos foram propostos.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Caracterização química e bioquímica do DDGS;
2. Utilizar o etanol como um co-solvente de extração de óleo do DDGS e recuperar compostos lipídicos;
3. Converter carboidratos presentes no DDGS em açúcares solúveis no líquido auto hidrolisado e determinar a temperatura e quantidade de sólidos necessários no processo para maior conversão de carboidratos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia renovável

Fontes de energia renováveis são elementos da natureza que servem como matéria prima para geração de combustíveis. A utilização excessiva de combustíveis fósseis acarreta em consequências ambientais negativas, por outro lado acaba estimulando a busca por combustíveis de fontes renováveis ou também chamados de biocombustíveis. Porém para produção de uma alternativa viável deve-se levar em conta alguns fatores como: ganho energético, benefícios ambientais, ser economicamente competitivo com outros combustíveis fósseis e ser produtivo em grandes quantidades sem reduzir o fornecimento de alimentos (GOLDEMBERG, 2007)

Aumentar a participação das fontes de energia renováveis na matriz mundial ajudará a prolongar a existência de reservas de combustíveis fósseis, enfrentar as ameaças colocadas pelas mudanças climáticas e permitir uma melhor segurança do fornecimento de energia. De acordo com dados do Ministerio de Minas e Energia, (2008), as fontes energéticas renováveis como a cana-de-açúcar, eólica e solar vêm aumentando sua participação na matriz energética brasileira, contribuindo para tornar o setor energético mais limpo e menos poluente (FREITAS; DATHEIN, 2013).

Segundo Tolmasquim (2011), são esperados investimentos que somam R\$ 97 bilhões na área de biocombustíveis no Brasil até o final de 2020 concentrados quase que integralmente na oferta de etanol.

A maior parte das "novas fontes de energia renováveis" ainda estão sendo estudadas, mas algumas tecnologias já estão bem estabelecidas, como por exemplo, o etanol de cana-de-açúcar brasileiro, que, por sua vez, torna a comparação entre custos inevitável quando se apresentam outras matérias primas, sendo esta a maior barreira competitiva para à adoção em grande escala da biomassa alternativa (GOLDEMBERG et al, 2007). Os biocombustíveis, se produzidos a partir de biomassa de resíduos, poderiam fornecer suprimentos e benefícios ambientais muito maiores do que os biocombustíveis baseados em alimentos (HILL et al., 2006).

3.2 Estrutura e produção do grão de milho no Brasil

O milho é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, espécie *Zea mays* L. A família possui sete gêneros, dos quais dois são nativos do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e cinco da Ásia. Devido à sua grande capacidade de acumulação de fotoassimilados é reconhecida como uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia existentes na natureza. (CRUZ et al., 2010).

Os grãos de milho são ricas fontes de fibra, vitaminas, minerais e fitoquímicos, incluindo fenóis, carotenóides, vitamina E, lignanas, b-glucano, inulina, amido resistente, esteróis e fitatos. Os alimentos que contêm quantidades significativas de fitoquímicos bioativos, por exemplo, várias classes de ácidos fenólicos, antocianinas, quinonas, flavonóides, chalconas, flavonas, flavanonas e compostos amino fenólicos (GANI; SM; FA, 2012).

Os grãos também contêm tocotrienóis, tocoferóis e fitosteróis, compostos fitoquímicos que desempenham importantes funções estruturais e de defesa em grãos. Os tipos de grãos e variedades influenciam a concentração dos fitoquímicos (ADOM; LIU, 2002).

Os grãos de milho consistem em três componentes principais: o endosperma, constituído de aproximadamente 80 a 90% de amido; pericarpo; e o embrião. A maior concentração de proteínas e amido encontra-se no endosperma do grão. O embrião é composto na sua totalidade de óleos e proteínas, enquanto as fibras de celulose e hemi-celulose compreendem o pericarpo do grão. A lignina é encontrada em todo o grão atuando como agente de ligação (DAVID JOHN SUNDQUIST, 2015).

Diferentes partes do milho possuem propriedades físicas e químicas diferentes. Estas diferenças proporcionam diferentes proporções de endosperma que constitui maior parte do grão. O endosperma farináceo é mais suave e mais fácil de ser quebrado do que o endosperma vítreo, podendo ser explicado devido as proteínas presentes, uma vez que sua presença forma uma matriz envolvente aos grânulos de amido (HADDAD; BENET; ABECASSIS, 1998). (JAMIN; FLORES, 1998). Esta diferença de dureza e susceptibilidade à ruptura estão entre as propriedades que podem

afetar a utilização de milho (Y. POMERANZ, C. R. MARTIN, D. D. TRAYLOR, 1984).

O amido do milho presente na sua maior parte no endosperma é um ingrediente valioso para a indústria alimentar utilizado como espessante, agente gelatinizante, agente de retenção de água e matéria prima para produção de etanol (SINGH et al., 2003). No entanto, assim como a fermentação por células de levedura estes sistemas incluem a liquefação e sacarificação dos materiais amiláceos através da adição de enzimas de sacarificação, o que aumenta significativamente o custo de produção do etanol.

Em países de clima tropical como Brasil, o milho pode ser cultivado em duas épocas distintas denominadas ,safra normal ou primeira safra, durante o verão; e a segunda safra ou ``safrinha`` que é cultivada em um curto espaço de tempo logo após a primeira safra ou após uma cultura de verão (CRUZ et al., 2010).

O grão de milho, por ser o cereal mais produzido no mundo, apresenta grande importância no mercado mundial sendo uma das commodities mais comercializadas no segmento do agronegócio segundo o United States Department of Agriculture (USDA) (USDA, 2015).

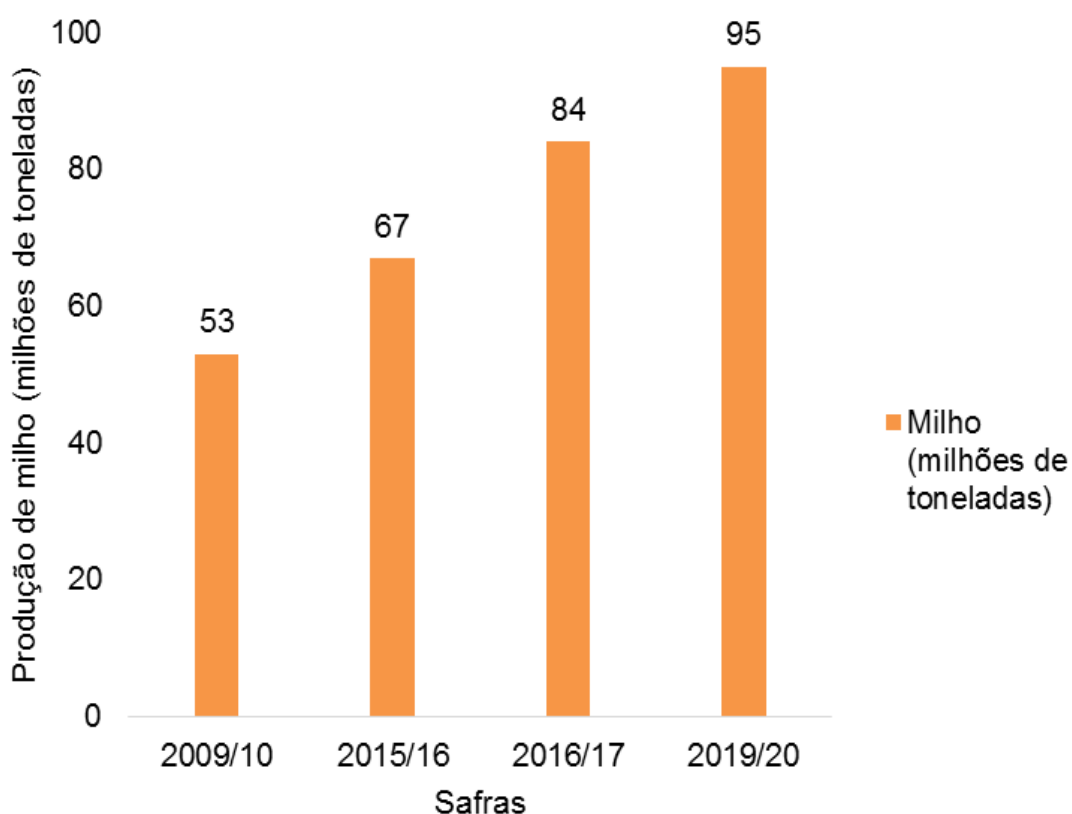
De acordo com o USDA, a produção mundial de milho na safra 2015/16, foi de 1.248,46 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores Estados Unidos, China e Brasil onde o consumo mundial foi de aproximadamente 1.248,32 milhões de toneladas, mostrando uma proximidade de produção e consumo para este período. A estimativa de produção mundial de milho para 2016/17 é de 1.319,65 milhões de toneladas, um aumento de, aproximadamente, 5.4% na produção mundial (USDA, 2015).

No Brasil, o milho é um dos insumos mais produzidos da cadeia agrícola, essa expressão na produção é estimulada pelos estados de Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, sendo que o estado de Mato Grosso o maior produtor de milho do país. (CONAB, 2016).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil finalizou a safra 2015/16 com uma produção de milho de,

aproximadamente, 67 milhões de toneladas, sendo estimado um aumento da safra para 2016/17 de, aproximadamente, 84 milhões de toneladas (Figura 1) (CONAB, 2016). Este aumento na produção brasileira de milho se deve, principalmente, ao aumento na produtividade e área plantada do grão onde, neste contexto, as projeções futuras seguem o mesmo padrão de crescimento de safra (CRUZ et al., 2010).

Figura 1 - Produção atual das safras de milho brasileira e estimativa futura



Fonte: dados do Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), (2016)

Segundo dados dos últimos anos, o Brasil produziu 84 milhões de toneladas na safra 2016/17 (figura 1), consumiu 58 milhões de toneladas da sua produção de milho, o que corresponde a 69% da produção, tornando-se assim, um dos maiores consumidores de milho do mundo, responsável por 5,7% do consumo mundial na safra 2016/17. Por outro lado, o excedente de aproximadamente 31% da produção não consumida, apresenta potencial para ser investido em outras práticas rentáveis como a indústria de etanol sem competir com a produção de alimentos (USDA, 2015)

A produção de milho brasileira é destinada basicamente para consumo humano, na forma de farinha de milho, fubá, quirera e óleo; e consumo animal, sendo 75% deste consumo destinado à alimentação de suínos e aves (COSTA JUNIOR et al., 2016).

3.3 Produção de etanol de milho

O etanol (C_2H_5OH) é uma fonte de energia renovável produzida através da fermentação de açúcares encontrados em produtos vegetais (cereais, beterraba e cana) sendo que para o milho sua maior fonte de açúcar são as moléculas de amido.

A demanda crescente de biocombustíveis estimula a produção de biocombustíveis derivados de óleos vegetais e etanol de matéria-prima como cana-de-açúcar e milho. Em 2006, os EUA ultrapassaram o Brasil como maior produtor de etanol do mundo, cuja produção aumentou de 0,7 milhões de metros cúbicos (m^3) em 1980 para mais de 18 milhões de (m^3). Para o ano de 2017, são esperados grandes aumentos de produção para até 130 milhões de m^3 de etanol (HETTINGA et al., 2009).

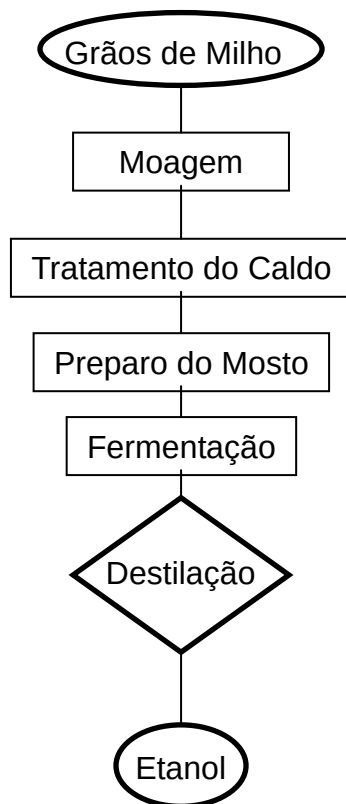
Devido à oscilação do preço dos combustíveis fósseis, a demanda por biocombustíveis estimula a ocupação de terras agrícolas de culturas com potencial para sua produção (BALAT, 2009). Consequentemente, melhorando ainda mais os rendimentos por unidade de área para a indústria de milho permitindo que ele seja viável economicamente como matéria prima.

O processo de moagem a seco é projetado para fermentar o máximo de milho possível. O grão do milho é moído através de um moinho de martelo, em seguida misturado com água para formar um mosto de milho e água (tratamento do mosto). O mosto é cozido e enzimas são adicionadas para converter o amido ao açúcar pelos processos de liquefação e sacarificação (preparo do mosto). Em seguida, a levedura é adicionada para fermentar os açúcares, produzindo uma mistura contendo etanol e sólidos de milho não fermentados. Esta mistura é então destilada e desidratada para criar etanol combustível.

O processo convencional de extração de etanol de milho apresenta oito etapas: recebimento do milho; moagem; tratamento do mosto; preparo

do mosto (cozimento, liquefação e sacarificação); fermentação; destilação; e por fim o etanol combustível (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma do processo de produção de etanol de milho



Fonte: Sperotto, F. C. S.

Enquanto o milho na sua média de produtividade gera cerca de quatro mil litros de etanol por hectare, a cana-de-açúcar, por sua vez, gera aproximadamente sete mil litros. Porém, no período de entressafra, a cana-de-açúcar não pode ser processada, já que não é possível estocá-la, diferentemente do milho que pode ser estocado ao longo do ano (ARTUR YABE MILANEZ, DIEGO NYKO, MARCELO SOARES VALENTE, CARLOS EDUARDO OSÓRIO XAVIER et al., 2005). Para cada unidade de milho processada em etanol, um terço retorna para o mercado de nutrição animal na forma de coproduto (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2013).

A utilização de milho como a principal fonte de etanol nos EUA gera quantidades consideráveis de coprodutos como os grãos secos de destilaria com solúveis (Distiller's dried grains with solubles (DDGS)), disponível em

grandes quantidades. Para cada litro de etanol produzido a partir de grãos de milho gera-se cerca de 0.6 kg de DDGS (PIMENTEL, 2003). Cerca de 10 milhões de toneladas de DDGS foram geradas nos EUA em 2006, onde o aumento estimado da produção de etanol aumentou a quantidade de DDGS produzido para cerca de 20 milhões de toneladas em 2012, cerca de 10 milhões de toneladas em seis anos (ERICKSON; KLOPFENSTEIN; WATSON, 2012; HERTEL; TYNER; BIRUR, 2010).

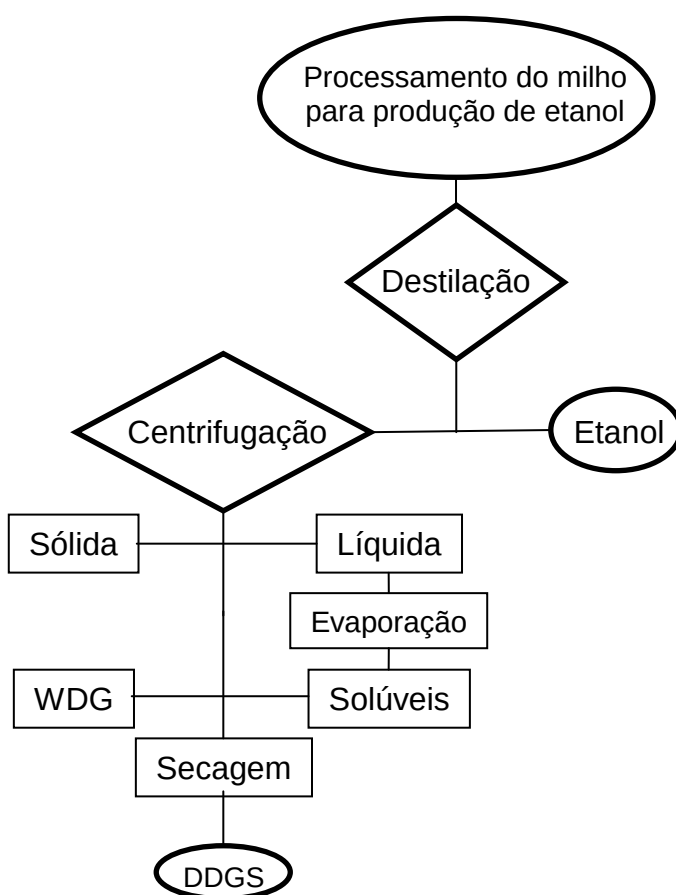
3.4 Grãos secos de destilaria com solúveis (*Distiller's dried grains with solubles (DDGS)*)

O DDGS (distiller's dried grains with solubles) ou grãos secos de destilaria com solúveis, é um coproduto da produção do etanol obtido da fermentação do amido de grãos de milho por leveduras. Os produtos finais da moagem a seco incluem álcool combustível, dióxido de carbono e grão secos de destilaria com solúveis (DDGS) (KIM; DALE, 2005).

Assim como no etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, durante a fermentação, a glicose é convertida em etanol pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A figura 3 apresenta o processo de produção do DDGS após a destilação passando pelos processos de: centrifugação; separação parte líquida e sólida; evaporação; secagem; até chegar no produto final o DDGS.

Após o processo de destilação os sólidos, remanescentes no líquido fermentado, são centrifugados e separados em parte sólida e líquida. A parte sólida é chamada de grãos úmidos de destilaria (WDG). A parte líquida passa pelo processo de evaporação para aquisição dos solúveis presentes neste mosto pós-destilação. Em seguida o WDG e os chamados solúveis são misturados e secos para se obter o DDGS que são usualmente usados como um suplemento alimentar para animais (BOTHAST; SCHLICHER, 2005).

Figura 3 – Fluxograma do processo de produção de etanol de milho



Fonte: Sperotto, F. C. S.

Os coprodutos agrícolas destacam-se tanto na comunidade científica quanto na industrial devido ao melhor aproveitamento de matérias primas no que se refere à produção de alimentos e combustíveis (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

O DDGS de milho tem sido muito utilizado como fonte de alimentação animal nos últimos cem anos nos Estados Unidos da América. A composição do DDGS e a quantidade de álcool produzido dependerão da composição inicial da matéria prima, neste caso mais importante, a concentração de amido dos grãos de milho (DAVID, 2015).

Este coproduto contém proteínas abundantes, óleos, amidos e hidratos de carbono estruturais de pectina, celulose e hemicelulose. Devido ao seu elevado valor nutricional, estes materiais são normalmente utilizados para a alimentação animal (GOESER; HOFFMAN; COMBS, 2009). No DDGS, a proteína o amido e os óleos são avaliados como materiais de fácil

digestibilidade, enquanto a celulose abundante e hemi-celuloses constituem a maior parte das porções de fibras que não são digeríveis por muitos animais (LAMSAL; PATHIRAPONG; RAKSHIT, 2012) e deverá ser considerado para a produção de outros bioprodutos de alto valor.

A fonte de variação na composição do DDGS não está bem documentada, porém estima-se que uma das principais causas expressas pelos processadores de milho é que a variação na composição do milho é uma das principais causas de variação na composição do DDGS (BELYEA; RAUSCH; TUMBLESON, 2004).

O DDGS contém óleo (8-11%), proteínas (cerca de 25-30%, com cerca de 50% de zeína), celulose (9-16%) e outros carboidratos. O óleo de DDGS (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013) tem propriedades semelhantes às do óleo de milho comercialmente disponíveis e podem ser utilizados quer na indústria alimentar ou como um biocombustível (XU; REDDY; YANG, 2007). A zeína, principal proteína do milho, é adequada para diversas aplicações, tais como películas, aglutinantes em tintas e também para fibras (LAWTON, 2002). No entanto, a zeína vendida atualmente no mercado obtida a partir de grãos de milho por via úmida é cara, com preço de venda de cerca de 8 a 10 dólares por libra.

3.4.1 Composição química e bioquímica do DDGS

A análise de minerais do DDGS é relatada como de suma importância para aqueles que consideram a utilização deste como um ingrediente em alimentos formulados. Para que a ração possa ser equilibrada necessita-se caracterizar adequadamente o conteúdo mineral do DDGS de diferentes fornecedores antes da incorporação do mesmo, uma vez que, a característica da amostra pode variar consideravelmente de acordo com vários fatores. A maior parte da variação no teor de nutrientes dos DDGS é, provavelmente, resultado da cultura de milho utilizada, porcentagem de solúveis adicionados aos grãos secos de destilaria para se obter o DDGS e sobretudo a duração do processo de fermentação, o que afeta o grau de remoção do amido, e o tempo e duração da secagem do WDG, que promovem processos químicos

e termoquímicos no interior das partículas de WDG, para posterior obtenção do DDGS (SPIEHS et al., 2002).

Os minerais exercem funções estruturais, fisiológicas, reguladoras e catalíticas essenciais no organismo animal, podendo as mesmas funções serem executadas por dois ou mais elementos conforme Tabela 5. Minerais como Ca e P auxiliam os organismos nas funções estruturais nos órgãos e tecidos do corpo, Ca nos ossos e dentes e P nas transmissão de energia (MENDONÇA et al., 2011).

A composição de minerais do DDGS serve para avaliar nutricionalmente esse coproduto considerando sua aplicação como ração. Minerais como cálcio (Ca), fósforo (P), cobre (Cu), enxofre (S), cobalto (Co) e selênio (Se) devem ter sua atenção voltada ao produto devido as funções metabólicas nos animais e para o correto funcionamento do sistema digestivo dos mesmos (Tabela 1) (SILVA; NETTO; SCUSSEL, 2016).

Tabela 1 - Valores sugeridos de minerais em rações para bovinos.

Macrominerais (%)	Valores Sugeridos (%)	
	Gado de Corte	Gado de Leite
Ca	0,17 - 1,53	0,53 - 0,67
S	0,08 - 0,15	0,20
P	0,17 - 0,59	0,32 - 0,44
Microminerais (mg.kg⁻¹)		
Cu	4,0 - 10,0	9,0 - 11,0
Co	0,07 - 0,11	0,11
Se	0,05 - 0,30	0,30

FONTE: Adaptado de (BORGES; PASCHOAL, 2011)(MENDONÇA et al., 2011)

O DDGS corresponde, aproximadamente, a 33% do valor total do milho utilizado na produção do etanol, já que os outros 66% são transformados em álcool e dióxido de carbono, elevando a concentração de minerais e tornando-se um fator limitante na alimentação de alguns animais. A concentração de vitaminas e minerais difere entre os lotes de DDGS devido à matéria prima e suas diferentes características de semente, produção e condições empregadas na planta de produção de etanol, processo fermentativo e de secagem. O DDGS de milho, na sua maioria, mostra-se

como uma fonte rica em vitamina A, niacina, colina, e fósforo, que é altamente biodisponível (LIM; LI; KLESIUS, 2011). Durante a produção de etanol, algumas usinas utilizam ácido sulfúrico para ajustar o pH das soluções, no entanto, a adição de ácido sulfúrico no processo de extração de etanol eleva a concentração de enxofre no DDGS (NUEZ ORTÍN; YU, 2009).

São três os minerais de grande importância presentes no DDGS de milho: Ca, P e S. Eles afetam diretamente o desempenho dos animais quando ausentes. O cálcio, quase que na sua totalidade, aproximadamente 99%, está relacionado com funções do esqueleto animal. Não menos importante, os níveis de Ca fora do esqueleto exercem funções fisiológicas essenciais na contração e relaxamento muscular, ativação enzimática e modulador das proteínas sanguíneas (SUTTLE, 2010).

O fósforo tem sua função atribuída principalmente à manutenção da estrutura óssea, constituinte de ácidos nucleicos e de fosfolipídios, atuando no metabolismo energético e no equilíbrio osmótico e ácido base (SUTTLE, 2010). Os níveis dietéticos de cálcio e fósforo são de suma importância na homeostase corporal e devem ser avaliados durante a formulação da ração dos animais (MOGODINIYAI KASMAEI; HOLTENIUS, 2013).

A alimentação de animais somente por plantas forrageiras não são capazes de atender as exigências em minerais principalmente quando se trata dos microminerais como Cobre, Cobalto e Enxofre, mesmo com a devida correção de minerais do solo via adubação, sendo necessária uma suplementação com outras fontes alimentares para balancear a dieta e não comprometer o desempenho dos animais em ganho de peso e desenvolvimento de carcaça (BORGES; PASCHOAL, 2011).

A proteômica consiste em analisar as proteínas em uma escala mais abrangente. Sua área de atuação é ampla englobando a identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos e fluidos biológicos; análise de mudanças na expressão das proteínas; caracterização de modificações pós-traducionais; e estudos de interações proteína-proteína, podendo revelar o funcionamento de componentes celulares (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003).

As proteínas são consideradas unidades funcionais de um organismo, que estão sujeitas a alterações, que podem ser cíclicas, de desenvolvimento, e/ou repostas às mudanças no ambiente (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003).

A proteômica em grãos é aplicada como uma ferramenta eficaz para análise de processos específicos e também avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos, incluindo alterações no genoma (mutação de inserção e regulação gênica) (ROSSIGNOL, 2006). Proteínas são especialmente interessantes para a avaliação de segurança e qualidade, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos. Apesar de vários métodos estarem disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa do proteoma de grãos (VAN WIJK, 2001; DAVIES, 2009), a literatura é escassa sobre o perfil proteômico do DDGS.

As metodologias utilizadas na obtenção do proteoma buscam separar, identificar e quantificar as proteínas de toda a planta, grão ou de um tecido específico (ROSSIGNOL, 2006).

No momento os esforços têm sido focados em abordagens alternativas para o estudo proteômico, como a proteômica “livre de gel” (gel-free), também conhecido como shotgun, onde frações peptídicas complexas que são geradas após a digestão da proteína são reveladas. As vantagens desta abordagem são a sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo quando trata-se de proteomas complexos (ABDALLAH et al., 2012; BARBOSA et al., 2012).

As proteínas mais abundantes em cereais, são as proteínas de armazenamento ou prolaminas, as quais são desprovidas de vários aminoácidos essenciais, sendo o principal deles a lisina (HABBEN et al., 1995). A família das proteínas zein são proteínas semelhantes, classificadas com base na sua solubilidade e massas moleculares, sendo as principais proteínas de armazenamento do milho (45-50%) (ANDERSON; LAMSA, 2011). Essas proteínas são ricas em ácido glutâmico (21-26%), leucina (20%), prolina (10%), e alanina (10%); porém são deficientes em aminoácidos, tais como lisina e triptofano, o que as tornam pobre em qualidade nutricional, contabilizando um balanço de nitrogênio dietético negativo. Além disso, sua insolubilidade na água limita sua utilização em produtos para alimentação humana, assim o foco principal desde meados do século XX tem sido na sua utilização como polímero industrial (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Pensando pelo fato de se utilizar o DDGS como fonte de energia na alimentação animal, as proteínas são tidas como os nutrientes com maior

valor de mercado. Encontra-se a disposição para compra DDGS com teor de proteína variando entre 25% e 38%, onde, esta variação, quando repassada para formulação de rações, pode afetar a produtividade animal podendo resultar em quantidades de proteínas insuficientes, o que provavelmente, reduziria a produtividade animal ou levaria ao uso excessivo de proteína, o que levaria a um gasto excessivo (BELYEA et al., 1998) (BELYEA et al., 2004).

A composição de proteínas dos grãos determinam características de qualidade e segurança, como o valor para alimentos, matérias-primas e coprodutos. A aplicação da proteína do milho agrega valores pouco conhecidos e explorados a este cereal. A zeína é uma das proteínas derivadas do endosperma dos grãos de milho, caracterizadas pelo alto teor de aminoácidos apolares (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Belyea et al., (2004) avaliaram a variação na composição de proteínas do DDGS, onde não foram relacionadas as variações entre as proteínas do DDGS em relação a composição proteica do milho, provavelmente, a variação se deu durante o processamento ou técnicas de processamento. Isto implica que, a redução da variação na composição proteica do DDGS exigirá a modificação das estratégias de processamento, e não na escolha da matéria-prima.

A concentração de zeína pode corresponder a até 60% do total de proteínas do grão de milho, sendo geralmente a alfa-zeína presente em maior concentração. Diferentes genótipos de milho causam variações na composição de proteínas. A alfa-zeína caracteriza-se por ser rica em aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina e prolina), a betazeína possui altos teores de aminoácidos sulfurados, a gama-zeína constitui-se de resíduos de prolina, e a delta-zeína contém em sua estrutura aminoácidos sulfurados além de prolina e leucina (DE OLIVEIRA et al., 2004). Porém, estudos adicionais devem ser realizados para determinar o perfil proteômico do DDGS, visto que a literatura é escassa de informações sobre as proteínas e o papel funcional destas, assim como uma possível relação das mesmas com a qualidade do coproduto do milho.

3.5 Composição lipídica do DDGS

A conversão do óleo do DDGS de milho para biocombustível é uma abordagem alternativa para posterior adição de valor a esta biomassa. A conversão através de alcoolize química usando metanol é o processo mais utilizado para fabricação de biodiesel (MOREAU; POWELL; HICKS, 1996). Apesar de este processo fornecer elevadas conversões de óleo em biocombustível, ele apresenta desvantagens tais como a produção de resíduos e dificuldade em separar o catalisador e o coproduto glicerina a partir do meio de reação (SINGH et al., 1999).

A recuperação de lipídios de DDGS é uma forma alternativa de utilização do produto. O teor de lipídios de DDGS de milho é maior do que a do próprio milho, sendo que, os lipídios encontrados no DDGS não são diferentes daqueles no milho. Em sua maioria o DDGS de milho apresenta concentrações de óleo entre 9 a 12%, sendo que o teor de óleo necessário na ração animal encontram-se entre 3 a 5%. Os lipídios de DDGS contem não só triacilgliceróis (TAG), mas também outros valiosos componentes lipídicos menores, como carotenóides, tococromanols (tocols) e fitosteróis. O isolamento de componentes lipídicos menores a partir de misturas de lipídios complexos está recebendo maior atenção devido à sua atividade e benefícios à saúde. Tocoferóis e tocotrienóis, conhecidos como tocols; e carotenóides são antioxidantes naturais importantes, já os fitosteróis são conhecidos por sua capacidade de reduzir o colesterol sanguíneo (GYLLING; MIETTINEN, 2005a). O conteúdo de lipídios menores em DDGS de milho é expresso entre 1,38% e 1,75%, sendo que esses lipídios menores são compostos por 0,6% de carotenóides, 9,2% de tocóis, e 90,2% de fitosteróis (CIFTCI; CALDERON; TEMELLI, 2012).

O óleo extraído a partir do germe de milho (GUNSTONE, 2011) é rico em tocoferóis, fitosteróis, ésteres de ácidos graxos e ácido ferúlico, que são típicos em óleos nutracêuticos. Tocoferóis e tocotrienóis, conhecidos como vitamina E, são antioxidantes importantes (YOSHIDA; NIKI; NOGUCHI, 2003) e quando consumidos, são conhecidos pela sua capacidade de baixar o colesterol no sangue bloqueando a reabsorção de colesterol a partir do intestino (GYLLING; MIETTINEN, 2005b). Dependendo da posição dos

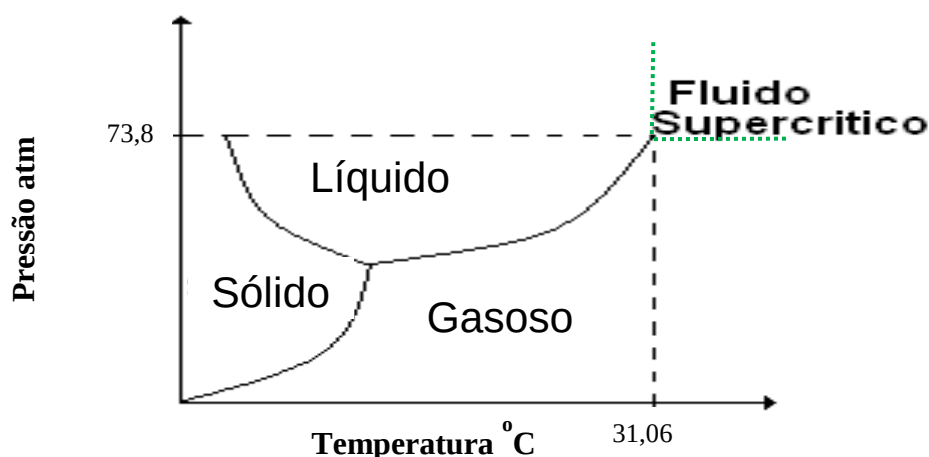
grupos metilo no anel de cromanol, os tococromanols são classificados em quatro homólogos: as formas α , β , γ e δ (SILES; CELA; MUNNÉ-BOSCH, 2013).

Os fitoesteróis possuem uma ampla cadeia de atividades biológicas e propriedades físicas. (LOCATELLI; BERARDO, 2014). A demanda por fitoesteróis como ingredientes nutracêuticos vem crescendo devido à busca pelos chamados "alimentos funcionais". Segundo alegação da FDA, alimentos para serem considerados funcionais devem conter em sua composição pelo menos, 0,65 g ésteres vegetais. O omega-3 é um dos principais componentes dos alimentos funcionais, realizando um papel positivo contra muitas complicações degenerativas e inflamatórias, tais como doenças do coração, acidente cerebral vascular, asma e alguns tipos de câncer (GEBAUER et al., 2006).

Os métodos tradicionais de extração via solvente são muito demorados e requerem quantidades relativamente grandes de solventes. Já existe uma crescente demanda por novas técnicas de extração com tempo de extração reduzido, reduzido consumo de solvente orgânico e aumento da prevenção da poluição. O método conhecido como extração via dióxido de carbono supercrítico é uma alternativa não explosiva, não tóxica, barata e que pode ser facilmente removida do produto final diferentemente do método tradicional que usam solventes orgânicos. A solubilidade do soluto no CO₂ supercrítico e a seletividade da extração podem ser modificadas em meio a mudanças na temperatura e pressão de extração via regulagem. O método de CO₂ supercrítico tem sido usado para extrair especialmente lipídeos menores e óleos essenciais (WANG; WELLER, 2006).

Qualquer substância que seja submetida a temperatura e pressão acima do seu estado crítico pode ser definida como fluido supercrítico, decorrente de uma mudança de estado líquido ou gasoso. Após passar por esta mudança de estado esta alteração modifica a densidade, poder de solubilização e comportamento químico das substâncias submetidas a este processo (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama de fases para obtenção do CO₂ supercrítico.



Fonte: Sperotto, F. C. S.

A importância de desenvolver novos usos e meios de agregar valor aos coprodutos da indústria de etanol torna essa prática ainda mais perto de obter sucesso e renda (USDA, 2012). Uma vez que apenas o amido e os açúcares são utilizados para a fermentação, a maior parte do óleo, proteína e fibra são mantidas no DDGS. Vários componentes de alto valor nutricional e probióticos podem ser isolados a partir de óleo de milho (ERICKSON; KLOPFENSTEIN; WATSON, 2012) (SPIEHS; WHITNEY; SHURSON, 2002).

3.6 Açúcares totais do DDGS

A fibra de milho derivada do DDGS pode ser uma matéria-prima valiosa para a produção de oligossacarídeos, que podem ser utilizados como um ingredientes funcionais.

Recentemente, a fibra tem sido separada do DDGS para produzir coprodutos benéficos, como um produto final com maior teor de gordura e proteína. O DDGS processado com menor teor de fibra tem potencial para ser usado em maiores concentrações em rações animais não ruminantes (SRINIVASAN et al., 2005).

A pouca funcionalidade da fibra do DDGS, diminui a sua utilização em alimentos para seres humanos e animais domésticos. A auto-hidrólise é um processo em que os produtos agrícolas são submetidos a uma transformação

hidrotérmica de alta temperatura. Neste processo, as fibras dietéticas são convertidas em oligossacarídeos solúveis funcionais não digeríveis, uma vez que este processo envolve o tratamento a temperaturas extremamente elevadas ($> 140^{\circ}\text{C}$) (ROSE; INGLETT; LIU, 2010)(ROSE; INGLETT, 2010a). Portanto, o uso de altas temperaturas podem aumentar a qualidade do DDGS, agregando valor ao mesmo, pela produção de oligossacarídeos benéficos presentes.

Monossacáridos polimerizados tendo um grau de polimerização (GP) entre 2 e 10 são definidos como oligossacarídeos. Os oligossacarídeos que não podem ser digeridos no estômago humano e no intestino delgado são considerados como ingredientes alimentares funcionais, com potencial para reduzir o risco e possibilidade de doenças cardíacas, infecções bacterianas / virais, diabetes, hepatite, enfisema e doenças neurológicas e musculares (GIBSON, 2004; KAWAKUBO et al., 2004; OHTSUBO; MARTH, 2006). Devido aos seus vários benefícios a saúde, os oligossacarídeos são usados em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Os oligossacarídeos mais utilizados são fruto-oligossacarídeos, oligossacarídeos malto-, galacto-oligossacarídeos, e XOS (YANG et al., 2014) (YUAN; WANG; YAO, 2006).

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros à base de xilose, considerados prebióticos. Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro, estimulando o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias, tais como espécies de bifidobacterium, no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Prebióticos têm aplicações em alimentos para humanos e ração animal. Diferentes métodos para produção de XOs são utilizados como: hidrólise enzimática, hidrólise ácida e auto-hidrólise do polímero de carboidrato. No método de auto-hidrólise, água e substrato são adicionados em um recipiente e a mistura é aquecida entre 100 a 250°C para produção de XOs através da quebra das moléculas de açúcar (NABARLATZ; EBRINGEROVA; MONTANE, 2007).

Samala et al. (2012) relataram que a produção de XOS pode ser realizada através da auto-hidrólise das fibras extraídas do DDGS de milho. Segundo o mesmo estudo, a produção de XOS aumentou à 180°C e diminuiu quando as temperaturas alcançaram de 200 até 220°C . Com o

devido aumento das temperaturas a partir de 200 °C, foi notado a formação de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural no líquido obtido da mistura do DDGS mais água (SAMALA et al., 2012). A maior concentração de monossacarídeos, no líquido auto-hidrolisado, com o aumento da temperatura, pode ser atribuído, à decomposição dos carboidratos em monossacarídeos, por outro lado, a diminuição do teor de monossacarídeos esta ligada a conversão dos monossacarídeos em outros compostos conhecidos como produtos de degradação. Neste caso, a degradação de pentoses levou à formação de furfural, enquanto a degradação de hexoses levou à formação de hidroximetilfurfural (HMF) (SAMALA et al., 2014).

Plantas de famílias monocotiledôneas, incluindo gramíneas, apresentam nas paredes celulares grupos de ácido fenólicos sendo o ácido férulico um dos principais e importantes ácidos demonstrando que a quantidade de ácido ferúlico libertada durante a saponificação das paredes celulares está correlacionada com um aumento na degradação dos polissacáridos da parede celular (ADOM; LIU, 2002). Este princípio pode ser usado para analisar o aumento na degradação de moléculas de açúcares do líquido autohidrolisado de DDGS após o processo de hidrotérmico (ROSE; INGLET; LIU, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em parceria entre a Universidade Estadual Paulista/ Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu e a University of Nebraska Lincoln nos Estados Unidos da América. Foram realizadas as análises no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP e no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da University of Nebraska. A amostra de DDGS foi obtida a partir de uma fábrica de ração local, da cidade de Lincoln/NE.

Após obtenção da amostra de DDGS a mesma foi analisada quanto a sua composição centesimal, proteínas e minerais para caracterização; após caracterização o DDGS foi submetida a dois tipos de processamentos para posterior extração de compostos de interesse tais como: Lipídios menores e açúcares totais.

4.1 Caracterização química e bioquímica do DDGS de milho

4.1.1 Análise centesimal do DDGS

Para a realização da análise centesimal do DDGS, foram determinados: teor de água, conteúdo de proteínas totais, lipídios, carboidratos e cinzas.

O teor de água foi determinado por dessecação, até o peso constante, em estufa a 105 °C (AOAC, 2007)

O conteúdo de proteína foi determinado com base na quantificação de nitrogênio total utilizando o destilador semi-micro *Kjeldahl*, onde utilizou-se o fator de correção de 6,25 (AOAC, 2007)

Para determinação de lipídios, utilizou-se o método de extração via *Soxhlet*, empregando éter de petróleo como solvente, conforme (AOAC, 2007)

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C, conforme metodologia descrita pela (AOAC, 2007)

O teor de carboidratos foi estimado por diferença em relação a soma dos teores de água, proteínas, lipídios e cinzas (AOAC, 2007)

4.1.2 Análise de minerais do DDGS

Para a análise de Minerais uma amostra única de DDGS foi analisada em seis repetições sendo elas em duplicata totalizando 12 leituras para cada mineral. Após a leitura dos dados foram feitas as médias e o desvio padrão.

4.1.2.1 Preparo das amostras

Foram pesadas cerca de 100 mg de cada amostra de DDGS em balança analítica em triplicata para cada tipo de ração. Cada porção de 100 mg de amostra pesada foi embalada em papel filtro e transferida para balões de Kjeldahl, nos quais foram adicionados, aproximadamente, 3 mL e 2 mL, respectivamente, de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio ambos p.a (Merck). Também foi feito um “branco”. Os balões de Kjeldahl foram colocados em bloco digestor, o qual foi aquecido a uma temperatura de, aproximadamente, 110°C. Todo esse procedimento foi feito em capela de exaustão de gases até completa destruição do material orgânico. Após resfriamento adequado, os extratos ácidos foram transferidos quantitativamente para balões volumétricos, no caso das rações com leveduras o volume foi completado com água destilada/deionizada até a marca de 50mL e, no caso do DDGS o volume foi completado também com água destilada/deionizada até a marca de 25 mL e homogeneizou-se o extrato ácido diluído (AOAC, 2007).

4.1.2.2 Determinações de Ca, Cu, Co e Se

As determinações de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) foram feitas utilizando-se soluções padrão Titrisol MERCK no preparo da curva de calibração. As condições operacionais utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000) (PEREIRA JUNIOR et al., 2009).

4.1.2.3 Determinação de P

A determinação de fósforo foi feita utilizando o método espectrofotométrico do ácido vanadomolibdofosfórico, “GENESYS”TM modelo 6. O comprimento de onda utilizado nas medidas de absorbância foi o de 420 nm (SILVA et al., 2016).

4.1.3 Análise proteômica

4.1.3.1 Estratégia de *Shotgun*

4.1.3.1.1 Extração das proteínas

Para extração das proteínas 1.5 mL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 % e um coquetel de inibidores de proteases foram adicionados às amostras (200 mg). Essas foram em seguida submetidas a agitação em vórtex por 12 h a 4°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4°C (Eppendorf, R5409) e o sobrenadante coletado.

4.1.3.1.2 Análise por LC/MS

Para esta etapa, 50 µg de proteína foram transferidas para um microtubo e a estas foram adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e 25 µL de surfactante RapiGest® 0,2% (Waters, Milliford, USA). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com DTT 100 mM por 40 min e posteriormente alquiladas pela adição de 300 mM de IAA por 30 min em temperatura ambiente. Em sequência, as proteínas foram submetidas à digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, 10 µL de TFA 5% foram acrescidos, seguida por incubação por mais 90 min a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 30 min. O sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado e submetido à análise por UPLC-MS (KRÄMER-ALBERS et al., 2007)

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY era equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *zea mays* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource).

Os dados obtidos do massas foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *zea mays* baixado do catálogo do UniProt (Universal

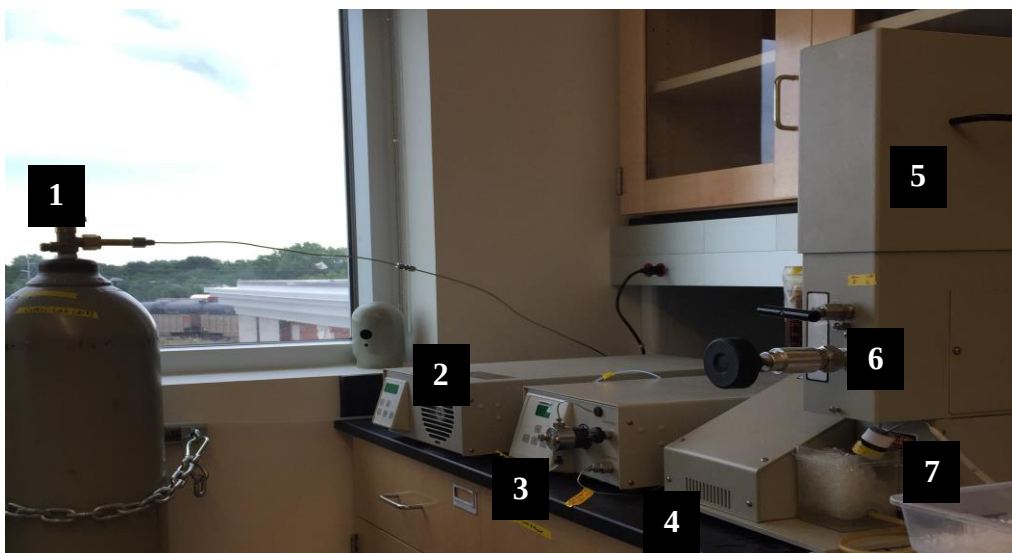
Protein Resource).

4.2 Extração de óleo via dióxido de carbono supercrítico

O óleo do DDGS foi extraído usando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), um método de extração “verde” que elimina a utilização de solventes orgânicos tóxicos no processamento de lipídios, para se obter uma fração de lipídios ricos em lipídios menores. Os lipídios das amostras de DDGS foram extraídos utilizando SC-CO₂ e etanol como modificador (co-solvente). Etanol foi utilizado como modificador para aumentar a polaridade do SC-CO₂ para melhorar a extração de lipídios menores polares. Extrações foram realizadas utilizando um sistema de SC-CO₂ (SFT-110, tecnologia de fluido supercrítico, Inc., Newark, DE/ EUA) a 50 e 70 °C, 30 e 45 MPa, 0; 2,5; 5 e 10% de concentração de etanol, em uma taxa de fluxo constante de CO₂ de 1 L/ min (medido em condições ambiente). Extratos lipídicos foram caracterizados pelos seus conteúdos de tocols e fitoesteróis. As condições de extração foram otimizadas para obter extratos de lipídios com o mais alto teor de lipídios menor (CIFTCI; CALDERON; TEMELLI, 2012).

A Figura 4 mostra o diagrama esquemático do sistema de extração de SC-CO₂. A temperatura máxima de operação e a pressão do equipamento extrator são 200 °C e 68,9 MPa, respectivamente. Para cada uma das extrações o recipiente de extração foi completado com DDGS de milho moído (30 g). O gás no recipiente com amostra foi injetado no recipiente com a amostra através da abertura do cilindro de CO₂. A válvula restritora de gás foi fechada e o recipiente de extração aquecido enquanto se controlava a temperatura do forno. Depois de equilibrada a temperatura, o CO₂ foi enviado para o sistema usando a bomba de alta pressão. Ao mesmo tempo, para as amostras com adição de etanol no momento de extração, a bomba foi aberta e deixada alimentando o etanol, a taxa de fluxo de gás foi calculada para compensar as proporções em estudo.

Figura 4 - Aparelho de extração via CO₂ supercrítico



Descrição: (1) cilindro de CO₂; (2) bomba de CO₂; (3) bomba de co-solvente; (4) forno; (5) sistema de pré-aquecimento, e câmara de extração; (6) válvula de controle de saída de extrato e válvula de controle micrométrica; (7) frasco de coleta de extrato.

A pressão foi monitorada e mantida constante utilizando a bomba de CO₂. O tempo de extração estático de 20 min foi estabelecido, mantendo a válvula restritora fechada. Em seguida, a válvula restritora foi aberta e a taxa de fluxo de CO₂ foi mantida a 1 L/min (medido em condições ambiente) com uma válvula micrométrica aquecida, e medida pelo medidor de fluxo de gás.

O óleo extraído foi recolhido continuamente num frasco de vidro mantido arrefecido a -10 °C. O óleo obtido a partir da extração SC-CO₂ modificada com etanol foi evaporado sob uma corrente de azoto, colocando o frasco em um bloco de aquecimento em 40 °C. A quantidade de óleo extraído foi determinada por gravimetria e expressa como uma percentagem da massa de DDGS utilizada na extração (peso de amostra / peso de óleo extraído (g)). Os frascos com amostras de óleo foram preenchidos com nitrogênio e armazenados a -20 °C até serem analisados.

4.2.1 Análise de lipídios menores

4.2.1.1 Teor de tocomanols

Os tocomanols ou tocols (tocoferóis + tocotrienóis) foram analisados de acordo com o método de Wang et al., (2007), O óleo de DDGS de milho (5mL) foi dissolvido em metanol: diclorometano (9:1) e analisado utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Série 1200, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector de fluorescência a um comprimento de onda definido de excitação comprimento de onda de 292 nm e de emissão de 330 nm. Uma alíquota de 70 µl foi injetada em uma coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm de tamanho de partícula; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA). A fase móvel foi constituída por metanol e água (metanol: água, 95:5, v/v) a uma taxa de fluxo de um mL/min. O tempo de retenção dos padrões de tocoferol foi usado para a identificação. A quantificação foi feita na sequência desenvolvendo uma curva de calibração para cada tocoferol. Os resultados foram apresentados em tocoferol mg por kg de óleo (BELAYNEH et al., 2015).

4.2.1.2 Teor de fitoesterol

Os teores de fitoesteróis do óleo de DDGS de milho foram determinados pela Hewlett-Packard (HP) 5890 Série II cromatógrafo de gás em interface com um espectrômetro quadrupolo simples MSD massa HP 5972 e um amostrador automático HP 7673A. Resumidamente, 50 mg de óleo foi misturada com 50 µl de padrão interno (5 α -colestano, 0,00225 g.mL⁻¹ em éter metil terc-butilico (MTBE)). O conteúdo foi em seguida saponificado por mistura com 2 mL de 1 N KOH metanólico e aquecido a 40 °C durante 1 hora. As amostras foram mantidas em local escuro durante 18 horas. Os lipídios não saponificáveis foram extraídos por adição de 2 mL de água deionizada seguida por uma adição de três vezes de solvente (hexano: MTBE, 1 : 1 v / v). A fase solvente foi transferida para outro frasco e a mistura

solvente foi evaporada por N₂. As amostras secas foram derivatizadas antes da injeção no GC pela adição de 300 µl de piridina e, em seguida, 1 mL de BSTFA ((N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) / trimetilclorosilano (TMCS), 99:1) e deixou-se esperar por 4 horas à temperatura ambiente. As amostras derivatizadas foram analisadas por GC-MS equipado com um capilar Rtx®⁻¹ coluna (0,25 mm x 30 m; Restek, Bellefonte, PA, EUA). Uma alíquota (um mL) da amostra foi injetada pela coluna a uma razão de divisão de 5:1. Foi utilizado hélio como gás transportador, a temperatura da coluna foi programada com uma espera inicial de 80°C durante 2 min, seguido por um aumento para 210°C há 15 minutos, para 250°C a 5 / min, a 275 °C a 12/ min seguindo por 40 min. O injetor e detector foram fixados a uma temperatura de 280°C. O padrão interno (5α-colestano) foi utilizado para a quantificação. A identificação foi realizada por comparação de dados de retenção e espectros de massa para aqueles na literatura de espectros de massa NIST. Todos os espectros de massa foram registados utilizando o modo de ionização de impacto de elétrons a 70V e massa gama 50-650 Da (CIFTCl; CALDERON; TEMELLI, 2012).

4.3 Extração de açúcares do DDGS via auto-hidrólise

Foi utilizado um biorreator para realização do processo de auto-hidrólise das amostras de DDGS com capacidade de 1,5 litros de amostra equipado com monitor de regulação de temperatura e válvula de resfriamento (Figura 5).

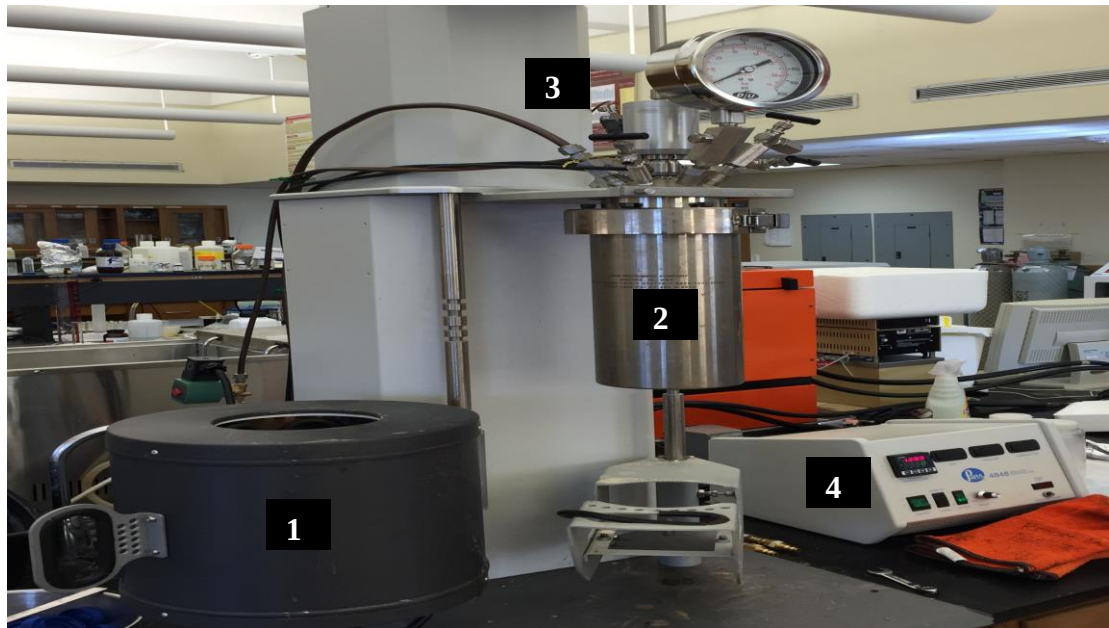
Tratamentos:

Os tratamentos variaram de 140 a 220 °C, enquanto que o total de sólidos, exclusivamente composto por DDGS, variou de 10 a 30%. Diferentes arranjos foram avaliados utilizando um delineamento composto central (Figura 6), onde o ponto central foi fixado em 180 °C e 20% de sólidos:

5 – Temperaturas °C (140, 152, **180**, 208, 220)

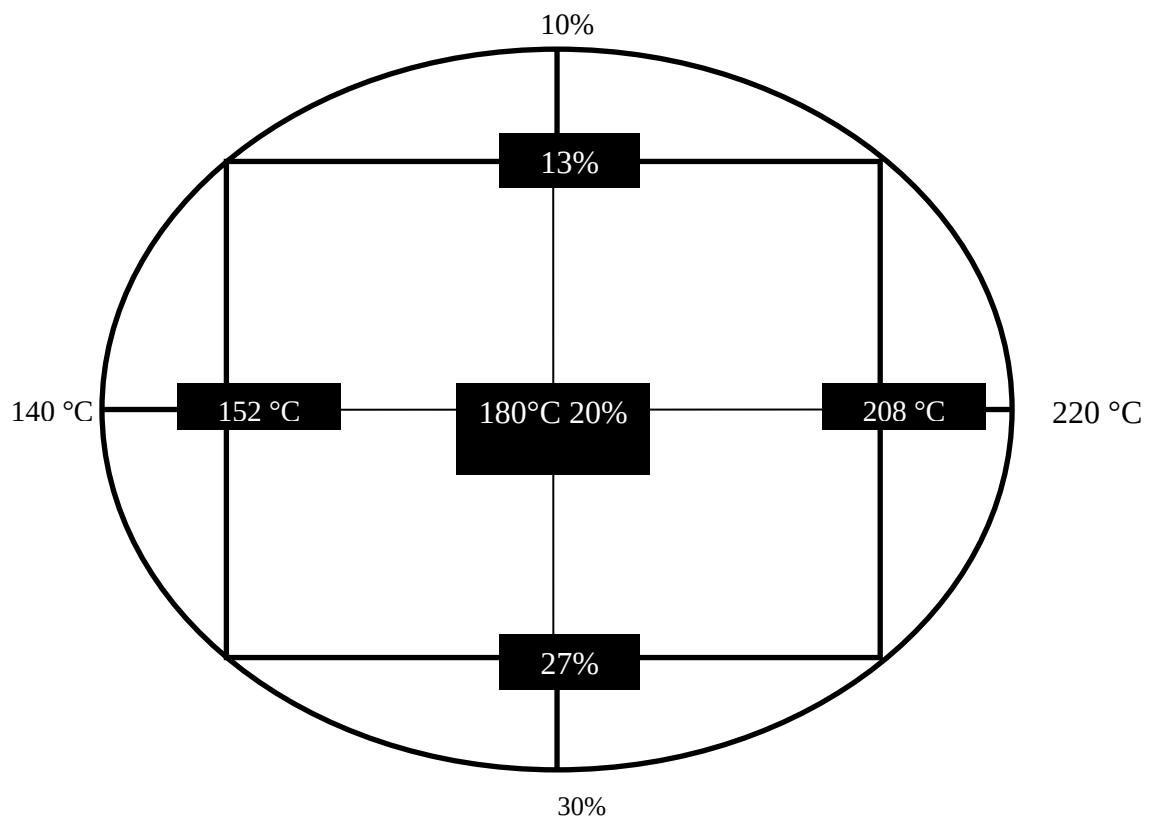
5 – (%) Solido/Líquido (10, 13, **20**, 27, 30)

Figura 5 - Biorreator utilizado para realização do tratamento hidrotérmico



Descrição: (1)forno; (2) câmara de extração; (3) válvulas de controle de pressão e arrefecimento; (4) painel de controle de entrada de dados de pressão Parr Reactor 4848.

Figura 6 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) com os parâmetros temperatura e sólido



Os tratamentos foram processados em duplicatas, onde, somente para o tratamento central 180 °C e 20% foram realizadas 12 repetições, uma vez que, este ponto foi tido como tratamento com máxima concentração de pentoses ao ser submetido ao tratamento térmico realizado posteriormente como pré-análise para montar o design do delineamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição do número de tratamentos envolvendo temperatura e quantidade de sólidos

Tratamentos	Temperatura °C	Sólido%	Numero de repetições
1	140	20	2
2	152	13	2
3	152	27	2
4	180	10	2
5	180	20	12
6	180	30	2
7	208	13	2
8	208	27	2
9	220	20	2

Os tratamentos hidrotérmicos foram conduzidos sob agitação constante (300 rpm). A mistura (DDGS + água) foi então aquecida em forno especial (Series 4520 1 & 2 Liter General Purpose Reactor Systems) (Figura 6), com energia calorimétrica suficiente para aumentar a temperatura de 20 °C (temperatura ambiente) até Temperaturas finais de 140 a 220 °C a 10 °C/ minuto sob constante controle de temperatura (Parr Reactor 4848), sendo então, imediatamente arrefecidas até 80 °C de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento, as amostras hidrolisadas foram centrifugadas a 1500 (g) durante 10 minutos e os sobrenadantes retidos no frasco de centrifugação.

A temperatura ótima para o tratamento hidrotérmico (180 °C) foi selecionada como a temperatura de tratamento que maximiza a liberação de carboidratos totais na forma de (Manose, Arabinose, Xilose, Glucose e Galactose). O DDGS foi transferido quantitativamente para o recipiente do reator nas seguintes porções: para o reator com capacidade para 1,5 litros as porcentagem de sólidos 10%, 13%, 20%, 27% e 30% de DDGS

corresponderam à 150g, 195g, 300g, 405g, 450g; com acréscimo de água até completar 1,5 litros. Na sequência os licores resultantes do aquecimento do DDGS mais água foram analisados

4.3.1 Carboidratos Totais

Após o DDGS ser submetido ao processamento hidrotérmico, as amostras auto-hidrolisadas foram analisadas para a quantificação de carboidratos totais, compostos fenólicos livres na forma de ácido ferúlico livre, compostos fenólicos totais na forma de ácido ferúlico total; furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (YANG et al., 2014).

Para determinar o teor de carboidrato total, uma alíquota do liquor auto-hidrolisado foi submetida à hidrólise sulfúrica ácida a 0,4 M (concentração final) a 125 °C durante 1 hora antes da redução, acetilação e análise (THEANDER, O; AMAN, P; WESTERLUND, E; ANDERSSON, 1995). O aumento da concentração de cada açúcar por hidrólise foi utilizada para determinar a soma da concentração total de açúcares (CAPARROS et al., 2007).

4.3.2 Concentração de ácido ferúlico livre e esterificado

Para a leitura do ácido ferúlico livre e ácido ferúlico esterificado, presentes na mistura (DDGS e água) auto-hidrolisada, foram pipetados 1 mL da fração líquida, em conjunto com 1 mL de água. Os frascos foram agitados durante 2 horas à temperatura ambiente, e, em seguida, 1,5 mL de ácido fosfórico a 0,4 M foi adicionado seguido por 1 mL de água, o que não tinha sido previamente adicionado. Quinze microlitros da amostra foram em seguida injetadas no sistema de HPLC (Shimadzu 10A) de acordo com as condições acima. A concentração de ácido ferúlico livre foi determinada pela diferença entre o teor de ácido ferúlico das amostras saponificadas e não saponificadas (XUE et al., 2012). O ácido ferúlico livre e esterificado foram determinados de acordo com Rose e Inglett (2010), para determinar a

degradação de moléculas de açúcares onde o maior percentual de ácido ferúlico indicará a menor degradação de pentoses.

4.3.3 Concentração de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

A concentração de furfural na amostra foi medida através da injeção de 10 µl da amostra autohidrolisada, adequadamente diluída, no HPLC Série 1100 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma coluna de fase reversa (Econosil C8, 260 mm/ 4,6 mm/ 0,5 µm, Alltech, Nicholasville, KY, EUA), a fase móvel utilizada foi (água: acetonitrilo (96: 4, v / v)). Para detecção do furfural foi usado um comprimento de onda de 280 nm e a quantificação foi obtida por comparação do tempo de retenção e área de pico da solução padrão de furfural (185914, Sigma-Aldrich). Furfural e HMF foram determinados de acordo com a percentagem de conversão de pentoses para furfural, onde, moléculas de açúcares são degradadas, após serem submetidas a altas temperaturas, a compostos como hidroximetilfurfural (ROSE; INGLETT, 2010a).

4.4 Análise estatística

4.4.1 Análise Centesimal

Após a coleta dos dados os mesmos foram apresentados como média e desvio padrão baseado no experimento em triplicado das análises. Não havendo necessidade de análise estatística.

4.4.2 Análise de Minerais

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão baseado no experimento em triplicado das análises. Não havendo necessidade de análise estatística.

4.4.3 Extração via dióxido de carbono supercrítico

Para a análise dos dados de rendimento de extração de óleo foram observadas seis amostras coletadas nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 minutos, com duas repetições de rendimento extraídos para cada tratamento de extração num delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística dos valores de rendimento foram comparadas utilizando análise de variância entre as médias (ANOVA), as diferenças significativas foram expressas em $p < 0,05$.

Para a análise de ponto de quebra da curva foram observadas seis amostras coletadas nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 minutos, com duas repetições de rendimento extraídos para cada tratamento de extração num delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística dos valores de rendimento foram comparadas utilizando (regressão não linear). As diferenças nos parâmetros de equações de regressão não-linear foram expressas com nível de significância de 5%.

Para os dados de perfil do óleo foi utilizado o método de Fisher de diferença mínima significativa para comparações múltiplas (Fisher's least significant difference (LSD), as diferenças significativas foram expressas em $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados foi realizada usando o pacote de software SAS (versão 9.3) (SAS Institute Inc., NC, EUA) com intervalo de confiança de 95%. O delineamento foi o inteiramente casualizado.

4.4.4 Extração de carboidratos totais via auto-hidrólise

Para a análise de concentração total de carboidratos; ácido ferúlico livre e esterificado; furfural e hidroximetilfurfural (HMF), foram realizadas análises de médias seguidas do teste *t*-student. Onde para isso levou-se em conta o parâmetro central com o tratamento 180 °C e 20% de sólidos. O delineamento foi o inteiramente casualizado, as diferenças significativas foram expressas em $p < 0,01$ e $0,05$.

Foram feitas comparações entre grupos de médias sob a seguinte disposição (Tabela 3):

Tabela 3 – Entrada dos dados no software conforme os grupos de tratamentos seguidos da análise de médias e teste *t*

		Tratamentos
Comparação	Grupo	°C / % de sólido
A x B	A	180 / 20
	B	Todos os outros tratamentos
C x D	C	todos 180 °C
	D	140-152-208-220 °C
E x F	E	todos 20%
	F	10;13;27;30 %

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise centesimal do DDGS

A composição centesimal do DDGS está descrita na Tabela 4. O valor encontrado de proteína para o DDGS foi de 26,42%, valor este que corrobora Shone (2015), que encontrou valores próximos de proteína em rações compostas por DDGS de 25,65%, farelo de glúten de milho 21,10% e grãos de milho 7,88%, onde os grãos de milho demonstram uma desvantagem proteica sobre o DDGS.

A quantidade de cinzas do DDGS encontrada neste estudo (4,81%) está próxima ao que Foltyn et al. (2013), obtiveram avaliando a composição do DDGS como ração para frango de corte (4,56%).

Segundo Ciftci et al. (2012), avaliaram a composição do DDGS de milho onde a concentração de carboidratos totais foi de 43,6%, proteína 33,7%, lipídios 11,2%, cinzas 2,0% e teor de água de 9,4% valores estes próximos ao encontrados neste estudo conforme demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise centesimal do DDGS de milho.

Compostos DDGS	%
Teor de água	9,82 ± 0,28
Cinzas	4,81 ± 0,04
Proteína	26,42 ± 0,04
Lipídios	8,61 ± 0,20
Carboidratos totais	50,34 ± 0,01

A variação na composição química em diferentes amostras de DDGS de milho deve-se muito ao fator matéria prima, manejos culturais durante o cultivo do milho, diferenças no processamento do grão durante o beneficiamento nas propriedades rurais e na indústria de etanol,

principalmente durante o processo de fermentação onde ocorrem a maior parte das reações químicas durante o processo de produção de etnaol do milho (ERICKSON; KLOPFENSTEIN; WATSON, 2012). Por tanto, independentemente do destino ou emprego do DDGS, como ração ou coproduto para outros fins, faz-se necessário um levantamento da sua constituição para a melhor utilização do mesmo.

5.2 Análise de minerais

De acordo com a Tabela 5, a concentração média de Se encontrada para a amostra de DDGS foi de $0,19 \text{ mg.kg}^{-1}$ corroborando Robinson et al. (2008), que encontraram para o DDGS concentração de $0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$. As concentrações de Cu e Co encontradas no DDGS estão acima dos valores sugeridos pela literatura, fator este que pode acarretar no desbalanço nutricional dos animais quando incorporado a uma ração sem o devido levantamento dos valores nutricionais da mesma.

De acordo com a Tabela 5, a concentração de 0,65% de Ca, 16,66% de S e 0,24 de P de uma mesma amostra de DDGS encontradas neste estudo corroboram Silva et al. (2016), que encontraram concentrações de Ca e P de 0,75 e 0,32 (%) respectivamente. Kleinschmit et al. (2006), encontraram para o DDGS de milho concentrações de Ca entre 0,6 a 0,7% e de P entre 0,34 a 0,38%, valores estes próximos aos encontrados para estes minerais neste trabalho.

Tabela 5 - Composição de microminerais (mg.kg^{-1}) e macrominerais (%) do DDGS de milho

	Microminerais		
	Cobre	Cobalto	Selênio
Média $\pm$ D.P.	$75,05 \pm 6,17$	$14,86 \pm 1,04$	$0,19 \pm 0,01$
	Macrominerais		
	Cálcio	Enxofre	Fósforo
Média $\pm$ D.P.	$0,65 \pm 0,08$	$16,66 \pm 1,51$	$0,24 \pm 0,02$

As diferentes concentrações de minerais afetam o valor e o uso final de DDGS como alimento para animais, estes parâmetros, estão relacionados não apenas a desordens nutricionais, mas também, ao excesso de minerais nos resíduos o que significa que o animal não está absorvendo o que lhe é oferecido, resultando também em desperdício de investimento (LIU; HAN, 2011).

5.3 Análise proteômica

De acordo com a tabela 4, a concentração de proteínas para a amostra de DDGS, descrita na análise centesimal, foi de 26.42 % (± 0.04). Para esta mesma amostra de DDGS foram realizadas análises proteômicas com o intuito de caracterizar quais tipos de proteínas estão presentes nestes 26% aproximadamente.

Após a coleta e execução dos resultados no banco de dados do UniProt, foram encontradas 191 proteínas com diferentes funções (Tabela 6). Uma vez que, as proteínas encontradas no DDGS são derivadas dos grãos de milho utilizados para a produção de etanol, a busca por informações destas proteínas estão baseadas no banco de dados do milho (*Zea mays* (Maize)), onde este apresenta 140.212 proteínas já encontradas para o milho, porém apenas 1.026 proteínas foram revisadas e bem caracterizadas.

As 191 proteínas encontradas podem ser usadas como marcadores para muitas propriedades do DDGS, indicando processos aos quais o mesmo foi submetido. Já a quantidade de uma proteína específica pode ser muito útil ao se analisar particularidades entre diferentes condições de processos.

Conforme a Tabela 6 (Apêndice), existem 69 proteínas não caracterizadas, as quais não se sabe ao certo quais são suas funções, porém sabe-se que elas estão presentes no genoma do milho. Destas 191 proteínas encontradas, 121 proteínas já estão caracterizadas pela literatura quanto as suas funções no grão de milho, sendo que as mais encontradas estão ligadas ao grupo de proteínas zein; elongation factor 1-alpha; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; e histone H2A.

A concentração da proteína elongation factor 1- α está altamente correlacionada com o teor de lisina no endosperma do milho, devido a mutação *opaque-2* que aumenta significativamente o teor de lisina no grão, através da redução da síntese de zein e aumento do acúmulo de proteínas que contém lisina (WANG et al., 2001).

5.4 Extração de óleo via dióxido de carbono supercrítico SC-CO₂

Verificou-se que a extração SC-CO₂ foi um método eficiente para extrair o óleo de DDGS de milho em comparação com método convencional via Soxhlet (hexano).

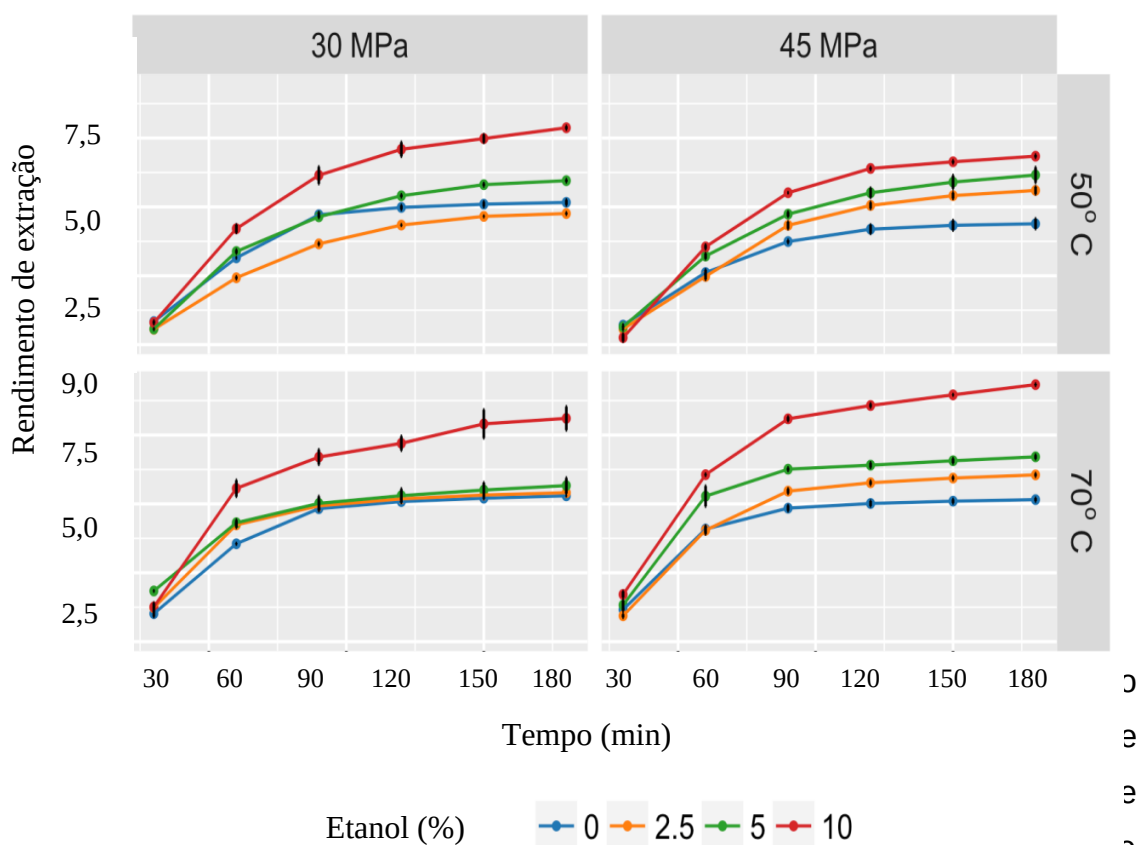
Tabela 7 - Rendimento em (%) da extração do óleo de DDGS via CO₂ supercrítico em 180 minutos e via Soxhlet em 8 horas

Rendimento de extração				
	Pressão (Mpa)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	%
CO ₂ Supercrítico	30	50 °C	0	5,2
			2.5	4,8
			5	5,9
			10	7,9
	30	70 °C	0	4,4
			2.5	5,6
			5	6,2
			10	6,8
	45	50 °C	0	5,3
			2.5	5,4
			5	5,7
			10	8,1
	45	70 °C	0	5,2
			2.5	6,1
			5	6,8
			10	9,3
Hexano (soxhlet)			8,61	

O rendimento total de óleo obtido com a extração via Soxhlet em 8 horas foi de 8,61% de óleo, enquanto que, via extração de SC-CO₂ com (10% de etanol) em 180 minutos foi de 9,3% de óleo (Tabela, 7).

Verificou-se pela Figura 7, que o comportamento das curvas de extração seguiram o mesmo padrão de comportamento para todos os tratamentos. Comportamento parecido com o encontrado por outros autores que investigaram a extração de óleo de DDGS via CO₂ supercrítico (CIFTCI; CALDERON; TEMELLI, 2012).

Figura 7 - Curvas de rendimento de extração via CO₂ supercrítico de óleo de DDGS em duas diferentes pressões e temperaturas e quatro diferentes porcentagens de etanol.



temperatura e pressão a maior porcentagem de adição de etanol (10%) obteve as maiores taxas de extração de óleo, seguidas das taxas de extração com adição de (5%) de etanol ao final dos 180 minutos. Segundo dados da literatura a extração via fluido supercrítico (EFS) usa menos energia de entrada do que o método via Soxhlet, portanto o custo operacional é menor para EFS (RAJAEI; BARZEGAR; YAMINI, 2005). Porém um estudo detalhado entre as duas técnicas necessita ser feito para se afirmar tal fato.

Na Tabela 8, verificou-se a interação dos tratamentos em função da análise de variância das médias obtidas pelas amostras. De acordo com os resultados todas as variáveis foram significativas quando comparadas, onde, a interação entre as três variáveis é dada pelas figuras 10, 11 e 12.

De acordo com a Figura 8, quando fixou-se as pressões (30 e 45 MPa) para analisar as possíveis variações da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e porcentagem de etanol (%) no rendimento de óleo extraído com seus pares, notou-se que, apenas para a pressão de 30 MPa e 2,5% de etanol como co-solvente houve diferença significativa entre as duas temperaturas (50 e 70°C) sendo que a 70°C obteve-se o maior rendimento de extração de óleo. Os demais tratamentos não se diferiram entre si.

Tabela 8 - Análise de variância entre os tratamentos Pressão, Temperatura e Etanol.

Análise de Variância					
Variáveis	GL	QM	SQ	F	Pr(>F)
Pressão (Mpa)	1	0.51	0.51	4.75	0.04*
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	1	3.11	3.11	29.29	5e-05***
Etanol (%)	3	42.93	14.31	134.63	1e-11***
Pressão : Temperatura	1	1.56	1.56	14.71	0.001**
Pressão : Etanol	3	1.81	0.60	5.68	0.007**
Temperatura : Etanol	3	1.64	0.55	5.15	0.01*
Pressão : Temperatura : Etanol	3	1.55	0.52	4.88	0.01*
Resíduo			16	1.7	0.1
Cód. Significância	0 '***'	0.001 '***'	0.01 '*'		

GL= Grau de liberdade

QM= Quadrado médio

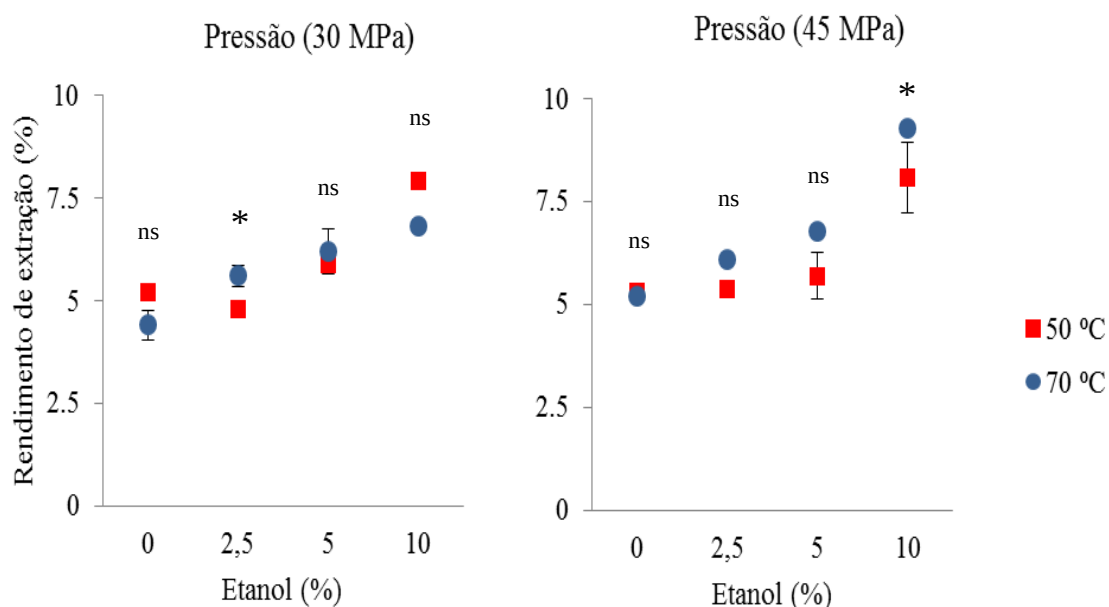
SQ= Soma de quadrados do resíduo

Quando comparou-se os tratamentos, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e porcentagem de etanol (%), para fixando-se a pressão em 45 MPa, o tratamento 70°C e 10% de etanol obteve o maior rendimento em comparação ao seu respectivo pare a 50°C , diferindo-se significativamente de acordo com o teste estatístico.

Portanto, quando se compara os tratamentos temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e porcentagem de etanol (%) dentro da mesma pressão, ou seja, em 30 MPa

ou 45 MPa, tem-se que, os diferentes níveis de etanol e as duas temperaturas sofrem influência significativa capaz de aumentar o rendimento de óleo de DDGS, porém, somente em dois únicos pontos a 2,5% de etanol em um pressão de 30 MPa e para 10% de etanol a 45 MPa de pressão, sendo que, para os dois casos a temperatura respectiva de 70°C.

Figura 8 - Eficiência de extração de óleo de DDGS em 180 minutos via CO₂ supercrítico fixando as duas pressões de extração.



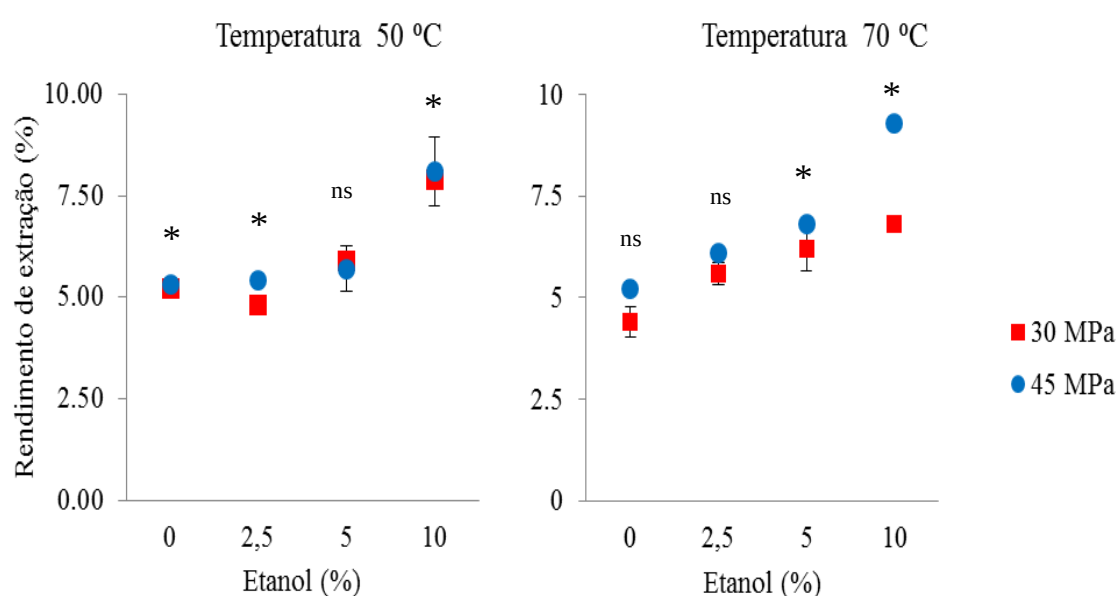
ns = não significativo, $p > 0,05$

* = significativo, $p \leq 0,05$

De acordo com a Figura 9, quando fixa-se as temperaturas (50 e 70 °C) e analisa-se as possíveis variações das pressões 30 e 45 (MPa) juntamente com as porcentagens de etanol (%) como co-solvente de extração, notou-se que, a 50 °C quando utilizou-se uma pressão de 45 MPa com 0; 2,5 e 10% de etanol, foi possível obter os maiores rendimentos de extração de óleo de DDGS de milho. Para o tratamento com adição de 5% de etanol não houve efeito significativo que fizesse com que as duas pressões se diferenciassem uma da outra a 50 °C. Com a adição máxima de etanol como co-solvente (10%) uma pressão de 45 (MPa) obteve-se o maior rendimento de óleo de 8,1% de óleo extraídos de 30g de DDGS

Quando comparadas as extrações realizadas em 30 Mpa de pressão, notou-se que, à diferença de temperatura não influenciou no rendimento de extração de óleo, onde a diferença do rendimento foi acrescida pelos diferentes níveis de adição de etanol, exceto para o tratamento com 2.5% de etanol que com a temperatura de 70°C

Figura 9 - Eficiência de extração de óleo de DDGS em 180 minutos via CO₂ supercrítico para fixando as duas temperaturas de extração.



ns= não significativo, $p > 0,05$

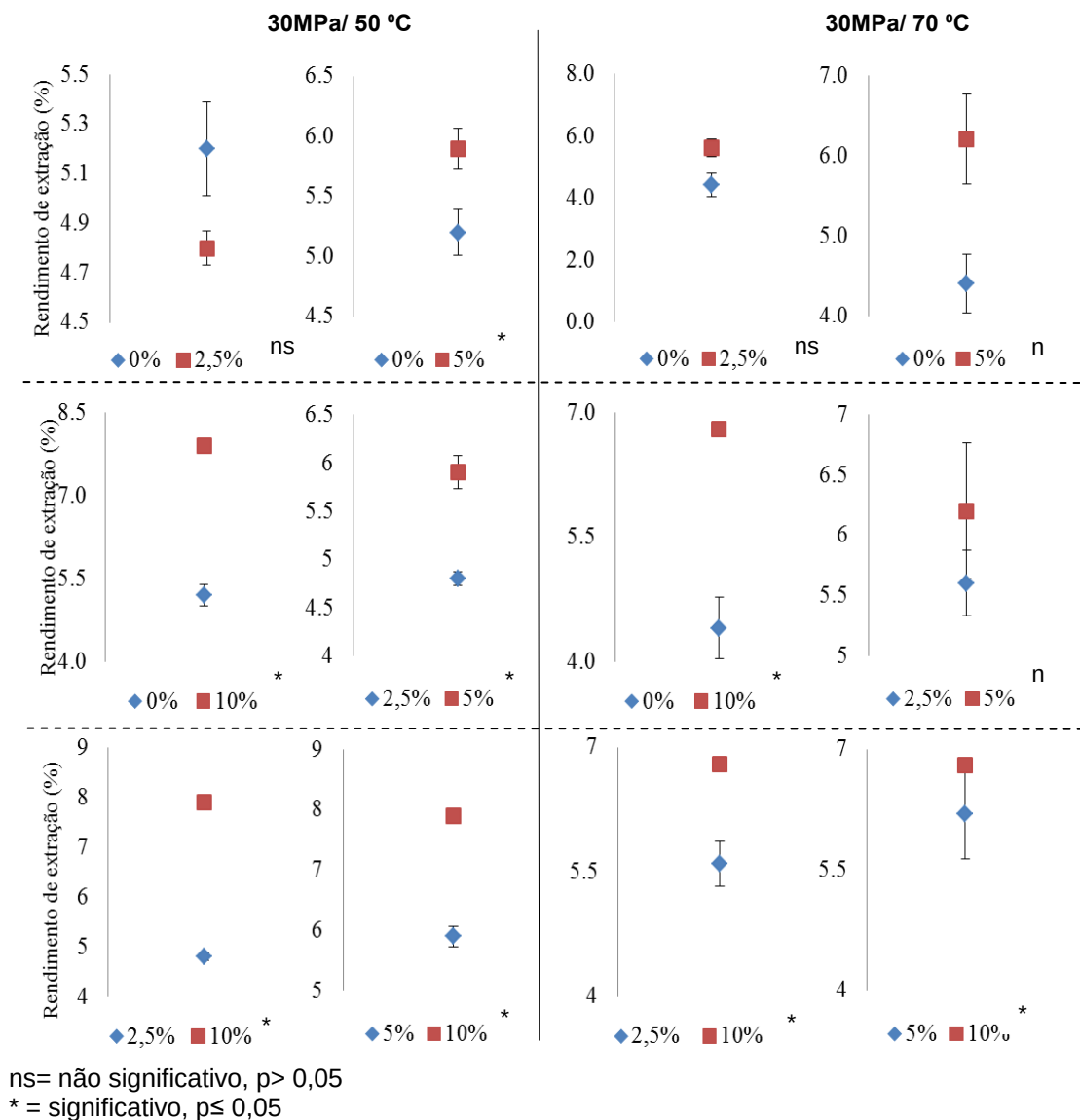
* = significativo, $p \leq 0,05$

Quando analisados os dados fixando-se a temperatura em 70 °C, observou-se que não houve influencia da temperatura para os tratamentos sem adição de etanol e com adição de 2,5 (%) entre as duas pressões. Porém, para os tratamentos com 5 e 10 (%) de etanol houve diferença significativa entre os tratamentos a 45 MPa, onde, os rendimentos de óleo foram de 6,8 e 9,3% respectivamente.

A figura 10 e 11, mostram as relações entre os tratamentos de acordo com as diferentes adições de etanol, comparando-as entre si dentro da mesma temperatura e pressão, ou seja, comparou-se a possível existência de diferença entre os rendimentos de extração de acordo com as diferentes

porcentagens de etanol (0; 2,5; 5 e 10%) dentro do mesmo tratamento tais como 30 MPa (50 e 70 °C) e 45 MPa (50 e 70 °C) .

Figura 10 - Eficiência da extração de óleo de DDGS em 180 minutos via CO₂ supercrítico para as diferentes adições de etanol.



De acordo com os dados da coluna esquerda da figura 10, para a condição 30 MPa e 50 °C, não houve diferença significativa apenas entre a extração sem adição de etanol, 0 (%), quando comparada com a extração a 2,5 (%) de etanol. Para as outras demais comparações os resultados foram diferentes significativamente mostrando que, para esta condição de pressão e

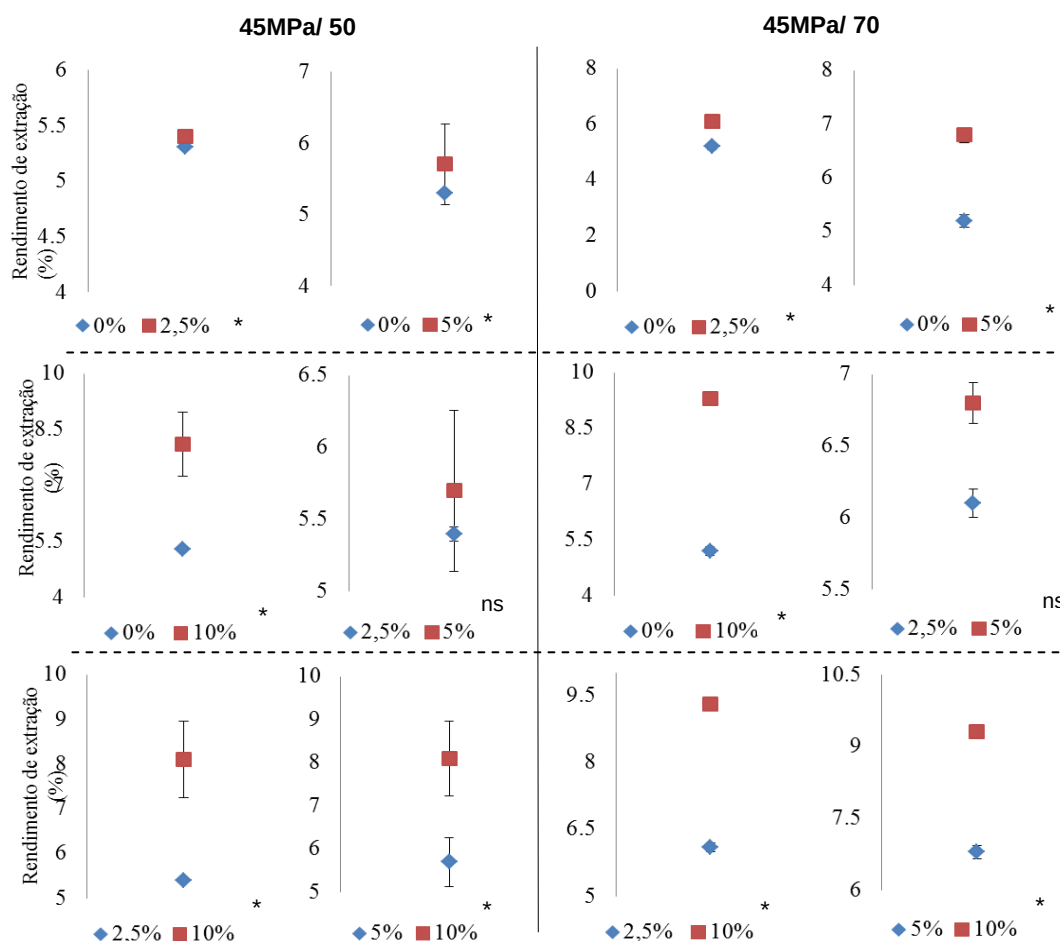
temperatura, conforme injetava-se as maiores porcentagens de etanol aumenta-se o rendimento de extração de óleo de DDGS de milho.

Quando analisados os dados para a condição de extração 30 MPa/ 70 °C apresentados na coluna direita da Figura 10, apenas quando se tem 10% de adição de etanol, a mistura de extração, foi significativamente diferente das outras porcentagens de etanol, conferindo a este resultado, que, a maior adição de etanol ao processo aumentou de 5,3% o rendimento de extração de óleo (rendimento sem adição de etanol) para 8,1% de rendimento de óleo extraído do DDGS de milho.

Analisando os resultados da figura 11, para a condição de extração 45 MPa/ 50 °C e 45 MPa/ 70 °C, pode-se dizer que, não houve diferença significativa no rendimento de extração de óleo apenas quando comparados 2,5 e 5% de etanol para as duas condições. Portanto, para uma pressão de 45 MPa a adição de etanol influenciou o rendimento de extração de óleo aumentando o mesmo nas condições com maior adição de etanol, neste caso 10%.

Após as análises dos dados de rendimento de extração, nos diferentes tratamentos, pode-se dizer que, a adição de etanol ao processo de extração de óleo de DDGS de milho via CO₂ supercrítico como co-solvente de extração, influenciou positivamente o processo mostrando que a adição de etanol aumenta o rendimento de extração quando comparado sem a adição de etanol. Fato este que comprova a hipótese levantada como objetivo do trabalho Wang et al., (2007), que concluíram que o uso do CO₂ supercrítico foi capaz de aumentar o rendimento de óleo extraído do DDGS de sorgo em comparação com o método convencional com hexano.

Figura 11 - Eficiência da extração de óleo de DDGS em 180 minutos via CO₂ supercrítico para as diferentes adições de etanol.

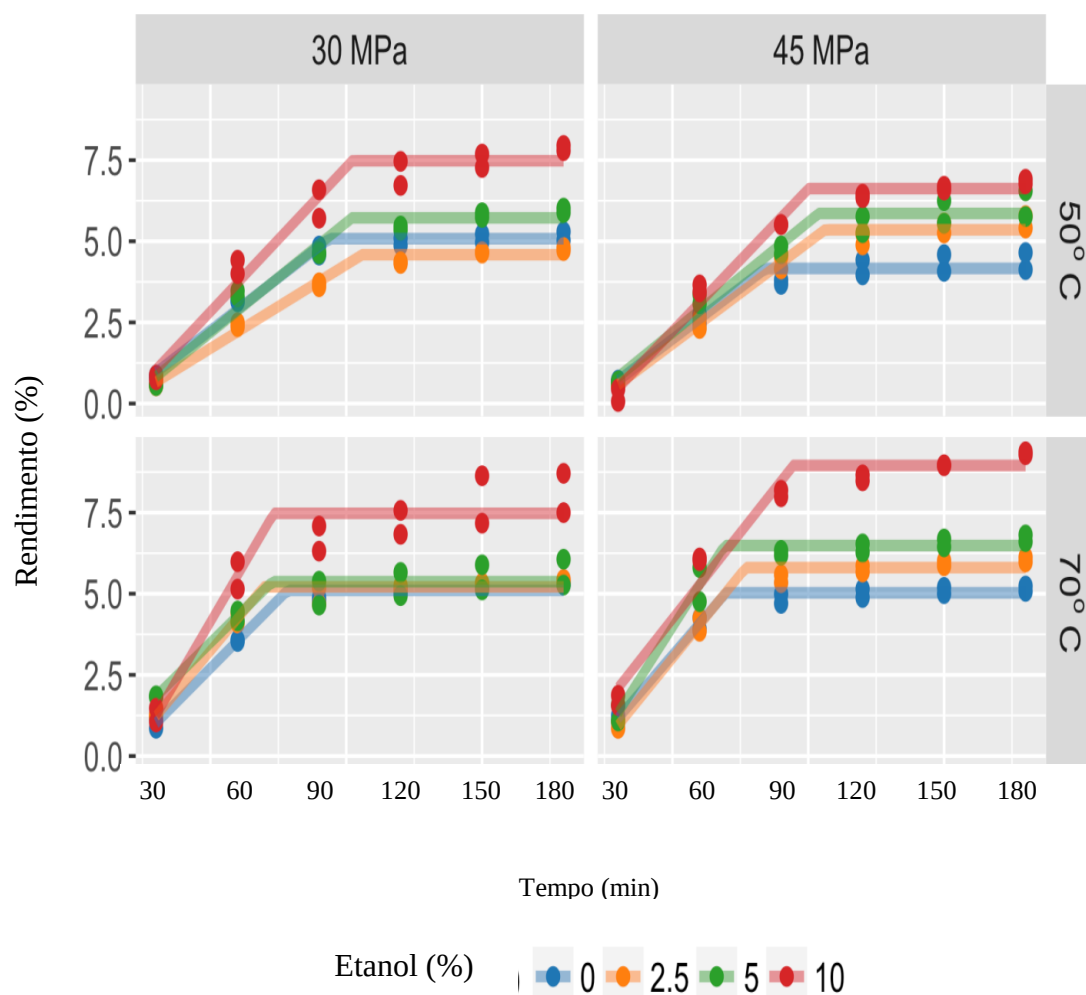


ns= não significativo, $p > 0,05$

* = significativo, $p \leq 0,05$

Utilizando as curvas de extração de óleo de DDGS, nos diferentes tratamentos aos 180 minutos, foi possível analisar, via regressão não linear, quais os pontos da curva onde obtém-se a quebra de rendimento do processo, ou seja, ponto da curva (em minutos) ao qual o rendimento de extração não apresenta variação significativa ao decorrer do tempo. Notou-se pela Figura 12, que os pontos se diferem de acordo com cada tratamento realizado.

Figura 12 - Ponto de quebra da curva de extração de óleo de DDGS em 180 minutos



O ponto de quebra ou ponto máximo (Figura 12) da curva de extração (min) para cada porcentagem de adição de etanol nas diferentes condições de temperatura e pressão, seguido da Tabela 9, mostram quais os valores exatos para cada ponto de quebra da curva.

Notou-se pela Tabela 9, que os pontos de quebra (P. Q.) para todas os tratamentos foram significativos em relação às médias de volume de óleo extraído nos tempos de coleta de amostras (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos). Por tanto, pode-se conferir a estes resultados que, o processo de extração de óleo do DDGS, com foco no volume de óleo extraído, pode ser realizado de forma mais rápida do que o realizado neste trabalho para todos os tratamentos.

Tabela 9 - Ponto de quebra da curva (P. Q.) de extração de óleo de DDGS em minutos

Pressão (Mpa)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	P.Q. (min)	Erro Padrão	p
30	50 °C	0	93.7	2.5	3e ⁻¹¹
		2.5	105.9	3.6	3e ⁻¹⁰
		5	102.1	4.8	6e ⁻⁰⁹
		10	102.2	5.0	8e ⁻⁰⁹
30	70 °C	0	78.4	2.8	4e ⁻¹⁰
		2.5	69.7	2.3	2e ⁻¹⁰
		5	72.8	5.8	5e ⁻⁰⁷
		10	73.3	6.0	7e ⁻⁰⁷
45	50 °C	0	84.3	7.4	1e ⁻⁰⁶
		2.5	106.1	4.0	7e ⁻¹⁰
		5	103.9	5.7	2e ⁻⁰⁸
		10	100.1	3.2	2e ⁻¹⁰
45	70 °C	0	69.7	1.9	4e ⁻¹¹
		2.5	77.0	3.0	9e ⁻¹⁰
		5	69.1	2.6	6e ⁻¹⁰
		10	94.5	4.0	2e ⁻⁰⁹

alfa significativo = p ≤ 0,05

A proposta da análise do ponto de quebra da curva de extração em relação ao tempo de execução busca elevar a eficiência do processo, onde, a economia de tempo de processo acarretaria em menos gastos financeiros como menor consumo de CO₂, menor consumo de energia elétrica, menor desgaste dos equipamentos sem prejudicar o rendimento de extração de óleo.

5.4.1 Perfil lipídico do óleo de DDGS de milho extraído via CO₂ supercrítico e via soxhlet

As análises do total de tocols (tocoferóis + tocotrienóis) e fitosterol, presentes no DDGS de milho, foram realizadas pela quantificação do perfil lipídico do óleo extraído anteriormente para a análise de rendimento de extração em 180 minutos. A soma dos componentes menores existentes no óleo de DDGS, acarreta no total de compostos estudados neste trabalho (BELAYNEH et al., 2015).

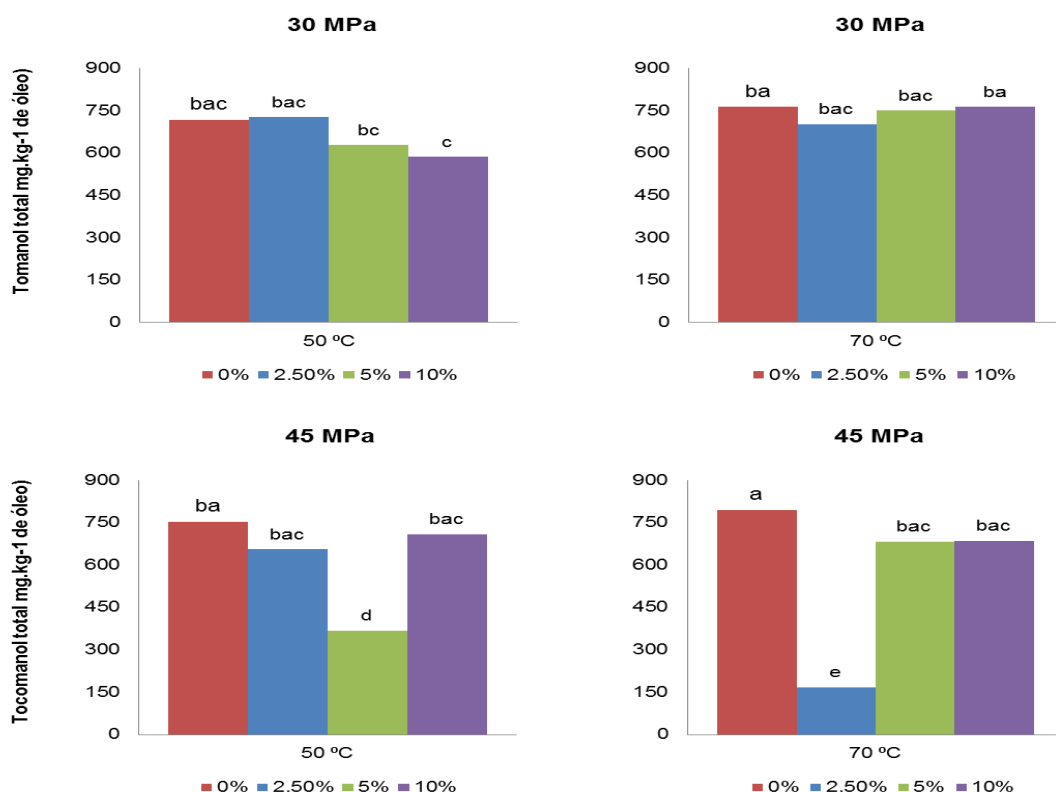
Os tocols e fitosteróis são substâncias que podem ser oxidadas facilmente na presença de O_2 a partir do ar. Para se obter o DDGS os grãos de milho passam por diferentes condições de processamento, destaque para a fermentação, até chegar aos processos de secagem, armazenamento e distribuição. A partir disto, pode se explicar o comportamento para o qual não houve tamanha diferença de concentração destes compostos entre os tratamentos realizados na extração do óleo.

5.4.1.1 Teor de tocomanol (tocoferol + tocotrienol) do óleo de DDGS de milho

De acordo com a Figura 13, a maior concentração de tocomanol total (tocotrienol + tocoferol) foi de 794 mg.kg^{-1} , encontrada no tratamento 45 MPa/ 70°C / 0% de etanol, diferindo estatisticamente dos tratamentos 30 MPa/ 50°C / 5% de etanol; 30 MPa/ 50°C /10% de etanol; 45 MPa/ 50°C / 5% de etanol; 45 MPa/ 70°C / 2,5% de etanol. A menor concentração de tocol foi obtida na extração com tratamento 45 MPa/ 70°C / 2,5% de etanol (168 mg.kg^{-1} de óleo). Verifica-se que o incremento em diferentes porcentagens de etanol, apesar de ter efeito significativo no volume final de óleo extraído conforme debatido nos parágrafos anteriores, não influenciou significativamente na recuperação de tocoferol e tocotrienol extraídos do DDGS de milho.

Segundo Belayneh et al., (2015), observaram o mesmo comportamento quando compararam as técnicas de extração de óleo de sementes de Camelina via CO_2 supercrítico, soxhlet e prensa a frio, onde os resultados mostraram que o teor de tocomanols do óleo extraído das sementes via CO_2 supercrítico foi de 801 mg.kg^{-1} , enquanto que foi de 682 mg.kg^{-1} e 695 mg.kg^{-1} via soxhlet e prensado a frio respectivamente. Estes resultados corroboram os encontrados neste trabalho e também outros relatos que o teor de tocoferóis e tocotrienóis dos óleos obtidos via CO_2 supercrítico foram semelhantes(WINKLER et al., 2007) (CIFTCI; CALDERON; TEMELLI, 2012).

Figura 13 - Concentração de tocomanol total (tocoferol + tocotrienol) em (mg.kg^{-1} de óleo) do óleo de DDGS de milho obtido via extração com CO_2 Supercrítico



Os valores são apresentados como a média com base nas extrações em triplicata. Letras diferentes para cada gráfico são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Segundo Winkler et al., (2007), as mais expressivas concentrações de tocols no óleo de DDGS de milho foram encontradas para δ -Tocoferol seguido por α -Tocoferol utilizando a técnica via CO_2 supercrítico em comparação com soxhlet. Porém neste mesmo estudo a quantidade de tocotrienóis foram superiores via soxhlet. Segundo os autores a quantidade de tocoferóis e tocotrienóis dos óleos extraídos dependem do solvente de extração.

A Tabela 10 mostra os resultados do perfil de tocomanol encontrados no óleo de DDGS de milho. O composto γ -Tocopherol apresentou a maior abundância dentre os outros compostos, sendo que para o tratamento 45 MPa/ 70 °C/ 0% de etanol a concentração encontrada foi de 374 mg.kg^{-1} , onde esta concentração não se diferiu significativamente dos outros demais tratamentos com etanol. Ou seja, assim como para os fitoesteróis, os

tratamentos com etanol como co-solvente de extração não foram capazes de recuperar lipídeos na forma de tocoferóis e tocotrienóis ao ponto de diferenciar os tratamentos com e sem etanol.

Tabela 10 - Perfil de tocomanol (tocoferóis + tocotrinóis) do óleo de DDGS de milho em (mg.kg⁻¹ de óleo), obtido via extração com CO₂ Supercrítico

Pressão (Mpa)	Temperatura (°C)	Etanol (%)	(mg.kg ⁻¹ de óleo)					
			δ-Tocoferol	γ-Tocoferol	α-Tocoferol	δ-Tocotrienol	γ-Tocotrienol	α-Tocotrienol
30	50 °C	0%	25 bcd	361 a	82 a	109 a	123 a	78 dc
		2.5%	25 bcd	351 a	79 a	92 b	122 a	79 dc
		5%	26 bcd	302 a	64 ba	36.5 c	114 a	85 bc
		10%	24 cd	330 a	69 ba	40.5 c	121 a	nd
30	70 °C	0%	30 a	347 a	78 a	97.5 ba	125 a	84 bc
		2.5%	25 bcd	355 a	78 a	44 c	126 a	74 d
		5%	28 ba	277 a	59 ba	36 c	142 a	93 a
		10%	28 ba	271 a	56 ba	41.5 c	144 a	90 ba
45	50 °C	0%	26 bcd	351 a	80 a	95.5 b	124 a	76 d
		2.5%	23 d	327 a	71 ba	43.5 c	116 a	74 d
		5%	nd	206 b	42 b	39.5 c	80 b	nd
		10%	26 bcd	354 a	74 a	42 c	131 a	80 dc
45	70 °C	0%	27 bc	374 a	84 a	96.5 ba	133.5 a	77 dc
		2.5%	nd	120 b	nd	nd	49 b	nd
		5%	25 bcd	330 a	70 ba	45 c	125 a	84 bc
		10%	25 bcd	343 a	72 ba	39.5 c	126 a	79 dc

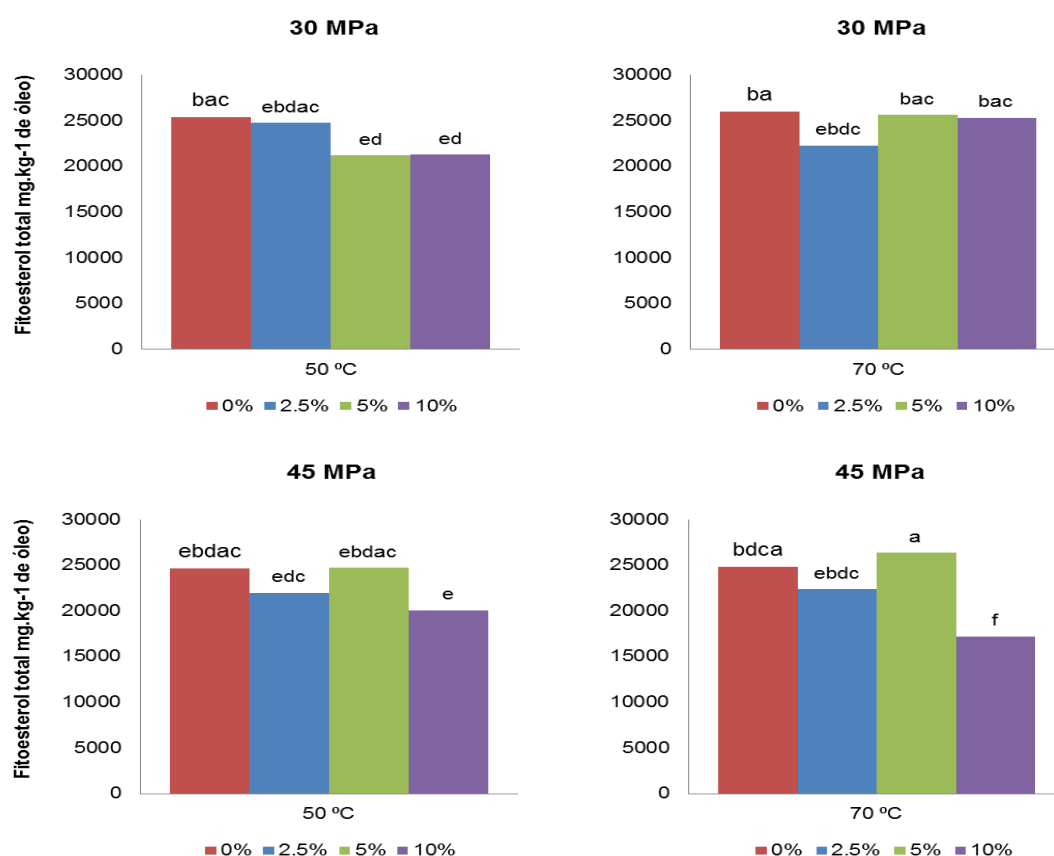
(Alfa = 0,05)

Resultados com a mesma letra na coluna não são significativamente diferentes.

5.4.1.2 Teor de fitosterol do óleo de DDGS de milho

De acordo com a Figura 14, a maior concentração de fitosterol total (26335 mg.kg⁻¹ de óleo), no óleo de DDGS de milho, foi encontrada no tratamento 45MPa/ 70 °C/ 5% de etanol, diferindo estatisticamente dos tratamentos 30 MPa/ 50 oC/ 5 e 10% de etanol; 30 MPa/ 70 °C/ 2,5% de etanol; 45 MPa/ 50 °C/ 2,5 e 10% de etanol; 45 MPa/ 70 °C/ 2,5 e 10% de etanol. A menor concentração de fitoesterol foi obtida no tratamento 45 MPa/ 70 °C/ 10% de etanol (17186 mg.kg⁻¹).

Figura 14 - Concentração de fitosterol total em (mg.kg⁻¹ de óleo) do óleo de DDGS de milho obtido via de extração com CO₂ Supercrítico



Os valores são apresentados como a média com base nas extrações em triplicata. Letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

Verifica-se para os fitosteróis totais o mesmo comportamento avaliado para tocoferol total, onde, o incremento de etanol, apesar de ter efeito

significativo no volume final de óleo extraído, não influenciou diretamente na recuperação de fitosteról total extraído do DDGS de milho.

Resultados estes, para fitosterol, que corroboram estudo realizado com a finalidade de investigar a eficiência de extração de óleo de *Camelina* via CO₂ supercrítico, via soxhlet e via prensagem a frio, onde, os resultados indicaram que o CO₂ supercrítico tem um maior potencial para extrair óleo de Camelina sem qualquer resíduo de solvente com maior rendimento de (BELAYNEH et al., 2015).

A quantidade total de fitosteról é dada pela soma do perfil de fitosteróis encontrados para o DDGS neste estudo. Neste caso foram utilizados os dados de campesterol, stigmasterol, β -sitosterol e avenasterol em (mg.kg⁻¹ de óleo) conforme observado na Tabela 11.

Tabela 11 - Perfil de fitosteróis do óleo de DDGS de milho em (mg.kg⁻¹ de óleo) obtido via extração com CO₂ Supercrítico e Soxhlet

Pressão (Mpa)	Temperatura (°C)	Etanol (%, w/w)	(mg.kg ⁻¹ de óleo)			
			Campesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Avenasterol
30	50 °C	0%	4078 a	1746 a	14358 ba	5170 ba
		2.5%	3834 ba	1619 bac	14093 bac	5188 ba
		5%	3512 bac	1491 bdc	12202 edc	4120 c
		10%	3362 ba	1435 dec	12021 edc	4430 bc
30	70 °C	0%	4107 a	1750 a	14616 a	5475 ba
		2.5%	3635 bca	1552 bdac	12586 bdac	4460 bc
		5%	4016 a	1725 ba	14611 a	5206 ba
		10%	3888 a	1697 ba	14366 ba	5322 ba
45	50 °C	0%	3880 ba	1632 bac	13903 bdac	5224 ba
		2.5%	3513 bac	1505 bdc	12202 ebdc	4756 bac
		5%	3804 ba	1593 bdac	14000 bdac	5306 ba
		10%	3043 dc	1309 de	11333 ed	4391 bc
45	70 °C	0%	3888 a	1612 bac	14006 bac	5315 ba
		2.5%	3559 bac	1507 bdac	12414 ebdac	4867 bac
		5%	4072 a	1750 a	14857 a	5655 a
		10%	2707 d	1152 e	9398 e	3929 c

(Alfa = 0,05)

Resultados com a mesma letra na coluna não são significativamente diferentes.

O grupo dominante de fitosteróis obtidos no óleo extraído via CO₂ supercrítico foi o β -sitosterol com maior concentração para o tratamento 45 MPa/ 70 °C/ 5% de etanol (14857 mg.kg⁻¹), corroborando (CIFTCl; CALDERON; TEMELLI, 2012)), que encontraram a maior concentração de fitosteróis para o β -sitosterol (7909 mg.kg⁻¹) em óleo de DDGS de milho extraído via CO₂ supercrítico. Este tratamento não se diferenciou estatisticamente de outros tratamentos com e sem adição de etanol.

Observou-se que o tratamento com maior pressão, temperatura e porcentagem de etanol, (45MPa/ 70°C/ 10%)nas menores concentrações de fitosteróis.

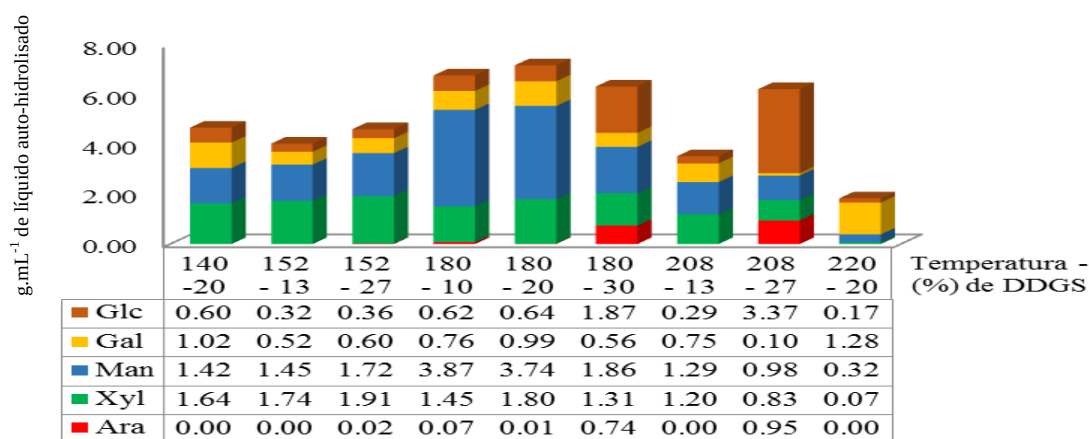
A interpretação dos dados do perfil de tocols e fitosteróis corrobora a ideia de que o uso de etanol apresentou significância positiva no que diz respeito a rendimento de óleo extraído, porém, não influenciou significativamente a porcentagem de recuperação de lipídios menores, sendo assim, o óleo extraído do DDGS de milho via CO₂ supercrítico com adição de etanol, pode ser explicado pelo incremento de outros compostos lipídicos presentes no óleo que não são os tocols e fitosteróis.

5.5 Extração de carboidratos totais via auto-hidrólise

A análise da figura 15, mostrou que o resultado da concentração final de carboidratos totais no líquido auto-hidrolisado do DDGS de milho foi composto pela soma dos carboidratos glucose (Glc), galactose (Gal), manose (Man), xilose (Xyl) e arabinose (Ara). Para os tratamentos 180 °C a 10 e 20% destacaram-se as concentrações de manose de 3,87 e 3,74 g.mL⁻¹ respectivamente.

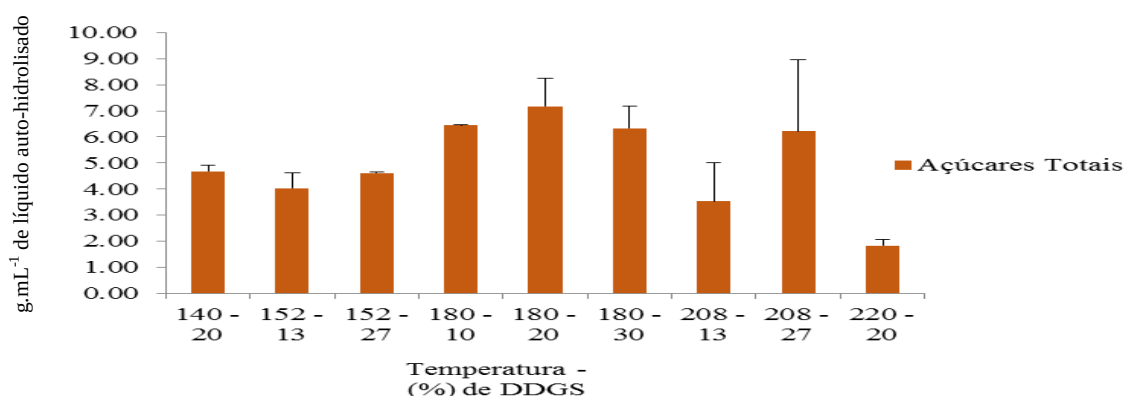
De acordo com (YANG et al., 2014), encontraram as maiores concentrações de monossacarídeos presentes no líquido hidrolisado de farelo de milho para a temperatura de 200 °C. Segundo os mesmos autores, concluíram que a temperatura de 190 °C obteve o maior rendimento de extração desse oligo e polissacarídeos da farinha de milho.

Figura 15 - Concentração de açúcares totais em (g.mL⁻¹ de líquido auto-hidrolisado de DDGS) em função da soma das pentoses e/ou hexoses



A análise do gráfico (Figura 16) possibilitou inferir que o tratamento com temperatura de 180 °C e 20% de sólidos apresenta uma média superior aos outros tratamentos.

Figura 16 - Concentração média de açúcares totais no líquido auto-hidrolisado de DDGS em (g.mL⁻¹)

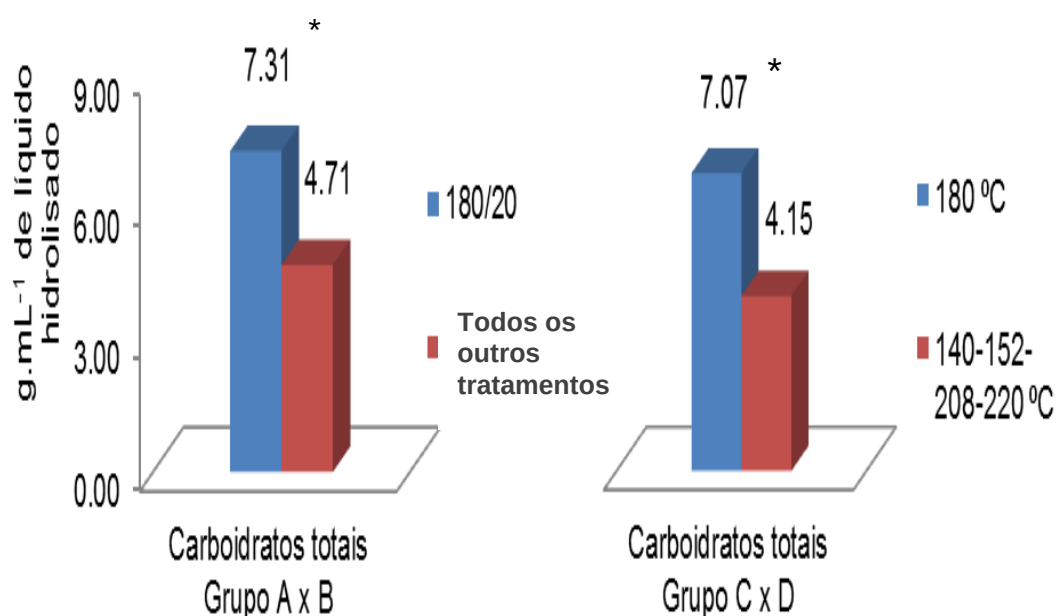


Para averiguar tal fato um teste de medias *t*-student foi realizado. Os grupos foram formados de acordo com a Tabela 2. O grupo (A) foi formado apenas pelas médias que compõe o tratamento 180 °C e 20% de sólidos enquanto que o grupo (B) foi formado por todas as outras médias dos tratamentos que não seguem essa combinação 180/20, por exemplo, 208/27. A média do total de carboidratos do grupo (A) foi 7,31 g.mL⁻¹ enquanto que a do grupo (B) foi 4,71 g.mL⁻¹. A hipótese nula do teste *t* assumiu que a diferença de medias (4,71 – 7,31 = -2,60) é igual a zero. O teste ainda

sugeriu que essa diferença é menor que zero a 1% de significância. Em outras palavras, o teste *t* reafirma a hipótese sugerida pela análise do gráfico, onde, o tratamento 180 °C/20% extraiu, em média, um nível maior de carboidratos totais, em (g.mL⁻¹) de DDGS de milho, do que todos os outros tratamentos (Figura 17).

Comparando as médias dos tratamentos do grupo C x D, onde, para o grupo C foram utilizadas todas as médias que passaram pelo tratamento a 180 °C e para o grupo D foram utilizadas todas as médias que não pertenciam ao tratamento à 180 °C, ou seja, de 140; 152; 208 e 220 °C. . A média do total de carboidratos do grupo (C) foi 7,07 g.mL⁻¹ enquanto que a do grupo (D) foi 4,15 g.mL⁻¹. A hipótese nula do teste *t* assumiu que a diferença de medias (4,15 – 7,07 = -2,92) é igual a zero.

Figura 17 – Teste *t* para as médias de carboidratos totais entre os grupos (A x B) e (C x D)



*= médias significativamente maiores (p<0.01)

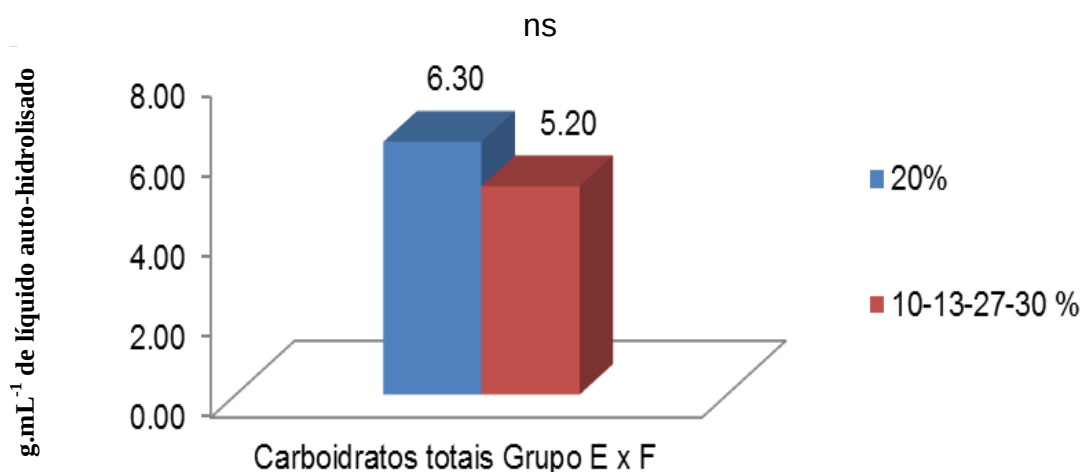
O teste ainda sugeriu que essa diferença é menor que zero a 1% de significância. Em outras palavras, o teste *t* reafirma a hipótese sugerida pela análise do gráfico, onde, os tratamentos com temperatura a 180 °C extraíram,

em média, um nível maior de carboidratos totais, em (g.mL⁻¹) de DDGS de milho, do que todos os outros tratamentos que não receberam temperatura igual a 180 °C. Esta análise possibilitou dizer que a temperatura de 180 °C influencia, diretamente e positivamente, o processamento quanto ao seu rendimento de extração de carboidratos independente da porcentagem de sólidos (Figura 17).

Comparando as médias dos tratamentos do grupo E x F (Figura 18), onde, para o grupo E foram utilizadas todas as médias que passaram pelo tratamento a 20% de sólidos e para o grupo F foram utilizadas todas as médias que não pertenciam ao tratamento 20% de sólidos, ou seja, 10; 13; 27 e 30% de sólidos. A média do total de carboidratos do grupo (E) foi 6,30 g.mL⁻¹ enquanto que a do grupo (F) foi 5,20 g.mL⁻¹. A hipótese nula do teste *t* assumiu que a diferença de médias (5,20 – 6,30 = -1,09) é igual a zero.

O teste ainda sugeriu que essa diferença é maior que zero a 5% de significância. Em outras palavras, o teste *t* afirma que a hipótese sugerida pela análise do gráfico, onde, os tratamentos com 20% de sólidos extraíram, em média, a mesma quantidade de carboidratos totais, em (g.mL⁻¹) de DDGS de milho, do que todos os outros tratamentos que não receberam esta quantidade de sólidos (20%), não se diferenciando estatisticamente.

Figura 18 – Teste *t* para as médias de carboidratos totais entre os grupos E x F



ns = médias não se diferem significativamente ($p > 0.01$)

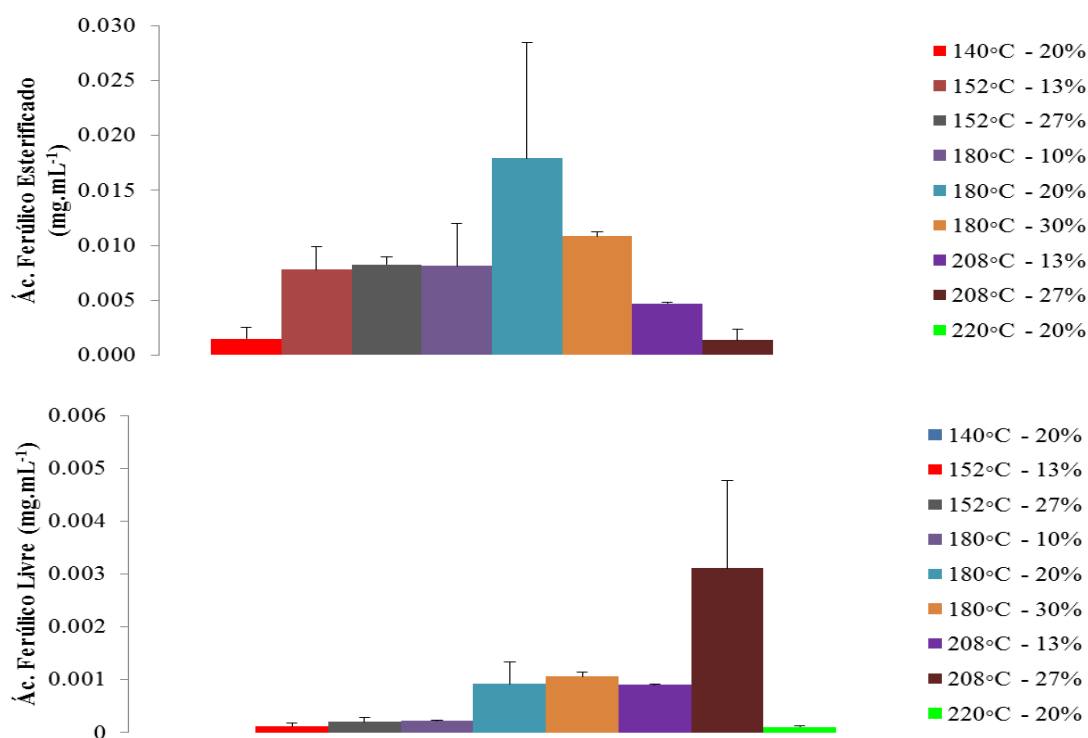
Esta análise possibilitou dizer que a quantidade de sólidos à 20% quando comparada sem a presença da temperatura 180 °C não tem influência positiva quanto ao seu rendimento de extração de carboidratos (Figura 18).

5.5.1 Concentração de ácido ferúlico livre e esterificado

A análise dos gráficos (Figura 19) possibilitou inferir que o comportamento de ácido ferúlico esterificado e livre encontrados no líquido hidrolisado de DDGS de milho não sofreram danos térmicos capazes de diferenciar as médias encontradas estatisticamente à 5%.

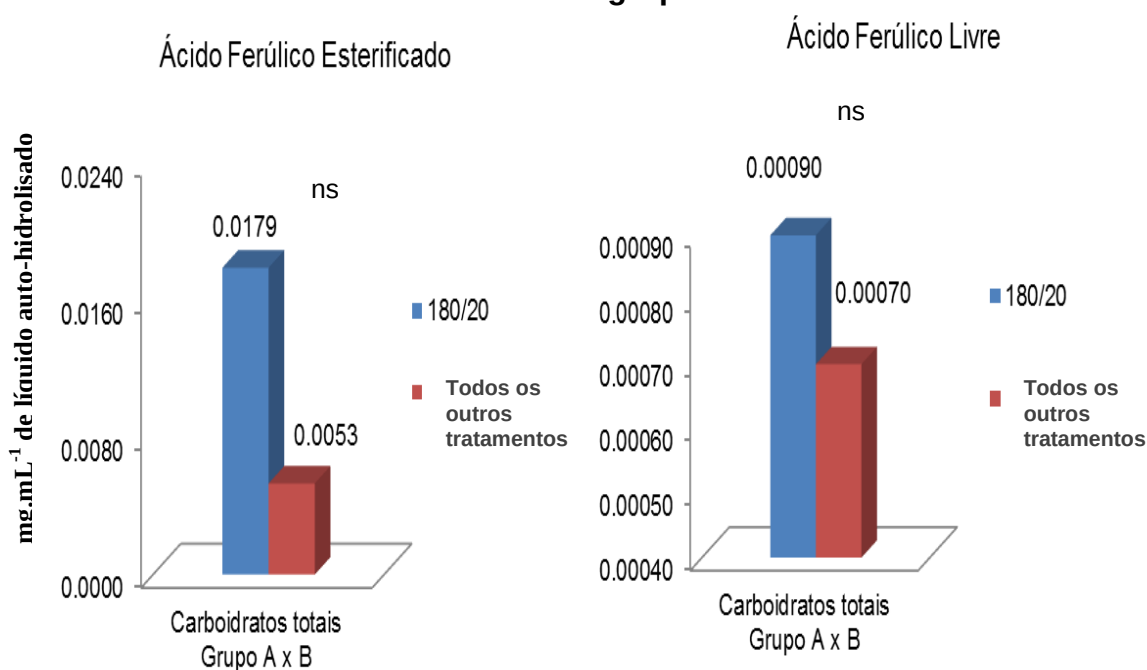
Seguindo a linha de análises, para averiguar os resultados descritos para a figura 19, um teste de medias *t*-student foi realizado. Os mesmos grupos foram mantidos de acordo com a Tabela 2. O grupo (A) foi formado apenas pelas médias que compõe o tratamento 180 °C e 20% de sólidos enquanto que o grupo (B) foi formado por todas as outras médias dos tratamentos que não seguem essa combinação 180/20 (Figura 20).

Figura 19 - Concentração média de ácido ferúlico esterificado e livre no líquido auto-hidrolisado em (mg.mL⁻¹)



As médias encontradas para ácido ferúlico esterificado e livre para o grupo (A) foram 0.0179 e 0.0009 mg.mL⁻¹, enquanto que a do grupo (B) foi 0.0053 e 0.0007 mg.mL⁻¹ respectivamente. O teste sugeriu que essa diferença é maior que zero a 5% de significância. O teste *t* afirma a hipótese sugerida pela análise do gráfico, onde, o tratamento 180 °C/ 20% não apresentou diferença significativa, comparado aos outros tratamentos, capaz de provocar uma condição favorável ou desfavorável de extração ao grupo (A), em relação ao aparecimento de substâncias indesejáveis no líquido hidrolisado. Para este estudo os níveis de ácido ferúlico não se apresentam como indicadores para escolha de uma ótima condição de tratamento térmico para extração de carboidratos do DDGS de milho (Figura 20).

Figura 20 – Teste *t* para as médias para Ácido Ferúlico Esterificado e Livre entre os grupos A x B



ns = médias não se diferem significativamente ($p > 0.05$)

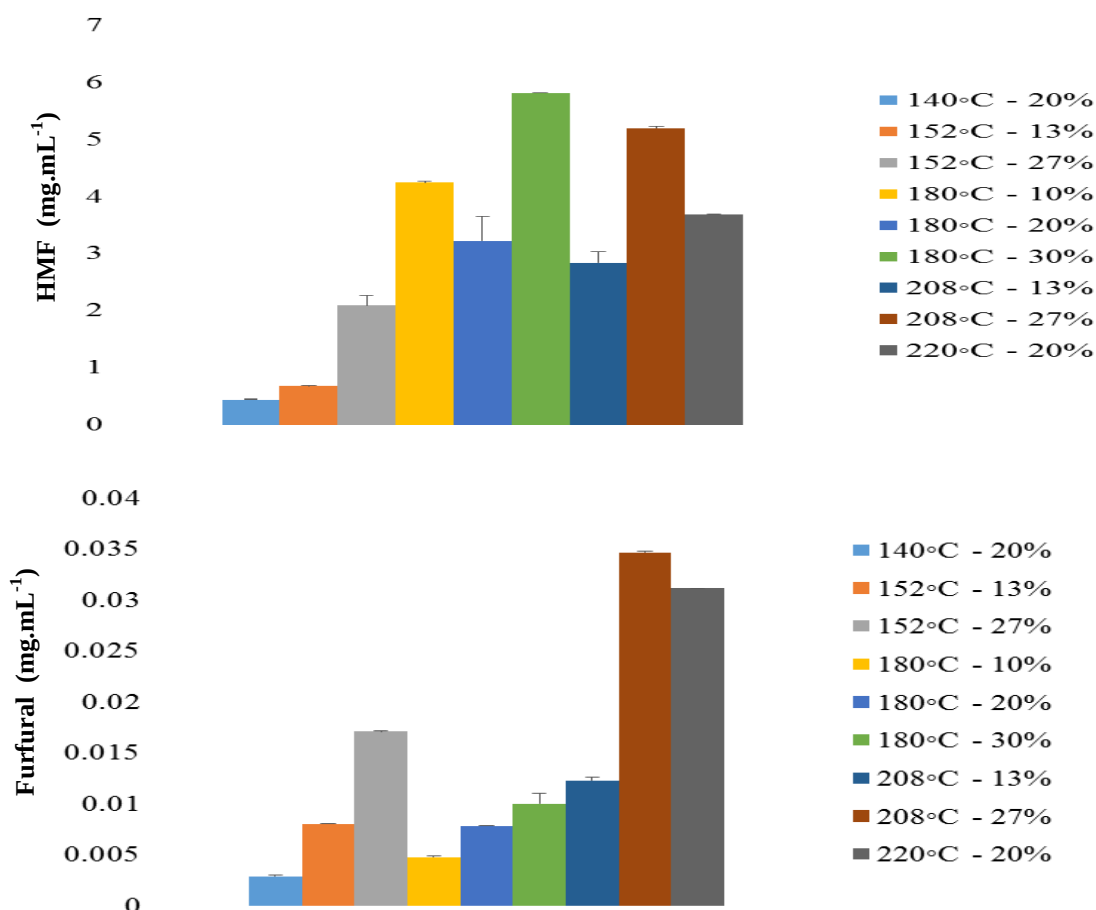
5.5.2 Concentração de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

A determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) ocorre devido a esses aldeídos serem os principais produtos da decomposição por hidrólise

da glicose e frutose na presença de altas temperaturas. No caso deste estudo o furfural e HMF foram usados como indicadores de processamento inadequado, ou seja, quanto maior a concentração dos aldeídos, mais moléculas de açúcares deixaram de ser recuperadas no líquido auto-hidrolisado devido a transformação dos açúcares em compostos indesejáveis.

. Segundo a Figura 21, avaliando a concentração de HMF e Furfural, no líquido hidrolisado de DDGS, o comportamento deste composto tende a aumentar conforme aumenta-se a temperatura corroborando (ROSE; INGLET, 2010b);(YANG et al., 2014); (SAMALA et al., 2012).

Figura 21 - Concentração média de hidroximetilfurfural e furfural no líquido auto-hidrolisado em (mg.mL⁻¹)

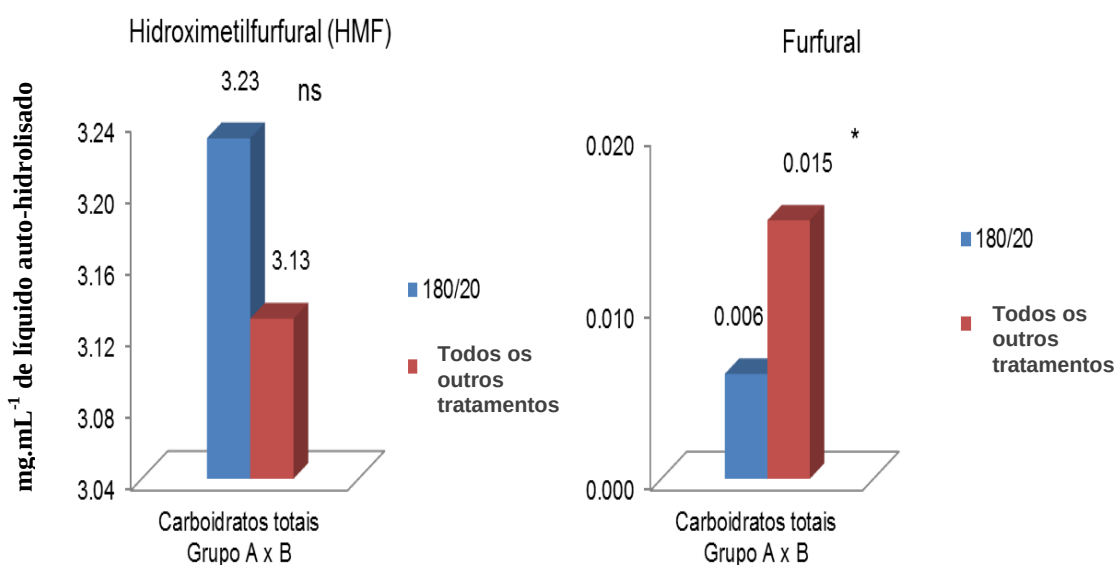


Seguindo a linha de análises para estes compostos, um teste de medias *t*-student foi realizado (Figura 22) . Os mesmos grupos foram mantidos de acordo com a Tabela 2. O grupo (A) foi formado apenas pelas médias que compõe o tratamento 180 °C e 20% de sólidos enquanto que o

grupo (B) foi formado por todas as outras médias dos tratamentos que não seguem essa combinação 180/20.

As médias de hidroximetilfurfural (HMF) do grupo (A) $3,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ e do grupo (B) $3,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ não diferiram-se à 5% de probabilidade, indicando o mesmo comportamento para todas os tratamentos comparados. Para as médias de Furfural foi possível afirmar a hipótese sugerida pela análise do gráfico, onde, o teste sugeriu que essa diferença das médias é menor que zero à 1% de significância.

Figura 22 – Teste t para as médias para Hidroximetilfurfural (HMF) e Furfural entre os grupos A x B



ns = médias não se diferem significativamente ($p > 0.05$)

* = médias significativamente maiores ($p < 0.01$)

O tratamento $180^\circ\text{C}/20\%$ obteve, em média, o menor nível de composto furfural $0,006 \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)}$ do que o grupo (B) $0.015 \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)}$. Portanto, o resultado da análise das médias de furfural serviu como indicador de otimização do tratamento (grupo (A)) como condições favoráveis de extração de carboidratos com menor degradação de moléculas de açúcares. O aumento das médias de furfural do grupo (B) se devem as altas concentrações de furfural para as temperaturas maiores que 180°C , no caso, temperaturas iguais a 208 e 220°C .

6 CONCLUSÕES

Para as condições deste trabalho conclui-se que:

A caracterização centesimal do DDGS mostrou que o processamento do milho para produção do etanol influencia nas características químicas finais de uma amostra para outra diferente.

A caracterização de minerais do DDGS mostrou que as concentrações de enxofre (S), cobre (Cu) e cobalto (Co) são maiores do que o indicado na formulação de rações para bovinos.

O uso das técnicas proteômicas possibilitou levantar 191 diferentes proteínas do DDGS ligadas as funções metabólicas do grão de milho na planta, sendo 69 já caracterizadas na literatura e 121 não caracterizadas;

A extração de óleo do DDGS de milho via CO₂ supercrítico apresenta maior eficiência em comparação com a técnica via soxhlet (hexano) em volume de óleo extraído;

A incorporação de etanol como co-solvente de extração via CO₂ supercrítico mostra-se mais eficiente, em relação ao rendimento de óleo extraído, em comparação com a não utilização de etanol e o uso da técnica via soxhlet (hexano), onde, observou-se a maior taxa de extração à 10% de incorporação de etanol como co-solvente;

A incorporação de etanol como co-solvente de extração mostrou-se ineficiente na recuperação de frações lipídicas tais como tocols e fitosteróis no óleo de DDGS em comparação com as extrações sem uso de etanol;

Carboidratos podem ser extraídos do DDGS de milho via autohidrólise, sendo que, a maior concentração de carboidratos totais em média foi obtida no tratamento à 180oC e 20% de sólido;

A menor concentração de furfural no líquido hidrolisado de DDGS de milho para o tratamento à 180°C e 20% de sólido indica que estas condições proporcionaram menor degradação de moléculas de açúcares que os demais tratamentos;

Os níveis de hidroximetilfurfural (HMF), ácido ferúlico livre e esterificado não se apresentaram como indicadores de tratamento térmico para extração de carboidratos do DDGS de milho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz-se necessária a ressalva de que o DDGS de milho, quando utilizado como produto de alimentação animal, deve ser caracterizado quanto a sua composição para que ao final o animal receba uma alimentação balanceada.

Faz-se necessário o estudo das frações lipídicas do óleo de DDGS com foco em outros elementos, uma vez que, o etanol como co-solvente aumentou o volume de extraído, porém, esse aumento não se converteu em quantidades de tocols e/ou fitosteróis, mostrando que o volume de óleo superior das condições com etanol não são constituídas desses compostos analisados.

Uma comparação econômica completa entre os métodos CO_2 supercrítico e soxhlet exigiria um estudo mais aprofundado, para que futuramente possa-se comparar a eficiência dos métodos com os seus respectivos custos.

8 REFERÊNCIAS

ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E B. (BRASIL). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2015Anp 2008**. [s.l: s.n.].

ANDERSON, T. J.; LAMSA, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159–173, 2011.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. [s.l: s.n.].

ARTUR YABE MILANEZ, DIEGO NYKO, MARCELO SOARES VALENTE, CARLOS EDUARDO OSÓRIO XAVIER, L. et al. 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**, v. 41, p. 147–208, 2005.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273–2282, 2009.

BELAYNEH, H. D. et al. Extraction of omega-3-rich oil from Camelina sativa seed using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 153–159, 2015.

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, n. 3, p. 293–298, 2004.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. **Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2003.

BORGES, L. E. M.; PASCHOAL, J. J. INFLUÊNCIA DOS MICRO-MINERAIS (Cu , Mn , Se e Zn) NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS BOVINOS. **Cuadernos de pós graduação**, 2011.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 19–25, 2005.

CAPARROS, S. et al. Xylooligosaccharides production from Arundo donax. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5536–5543, 2007.

CIFTCI, O. N.; CALDERON, J.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of corn distiller's dried grains with solubles: Experiments and mathematical modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 51, p. 12482–12490, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos. **Observatório Agrícola**, v. 2, n. 4, p. 1–60, 2016.

COSTA JUNIOR, G. et al. Elasticidades de transmissão espacial de preço do milho no Brasil: Um estudo para o Mato Grosso. **Economia & Região**, v. 4, n. 1, p. 63, 2016.

CRUZ, J. C. et al. Cultivo do Milho. **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 10, 2010.

DAVID JOHN SUNDQUIST. DRIED DISTILLERS GRAINS WITH SOLUBLES AS A MULTIFUNCTIONAL FILLER IN WOOD PARTICLEBOARDS A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the North Dakota State University of Agriculture and Applied Science By David John Sundquist In Partial Fulfillment of t. **Pro Quest LLC**, n. March, p. 87, 2015.

DE OLIVEIRA, J. P. et al. TEOR DE PROTEÍNA NO GRÃO EM POPULAÇÕES DE MILHO DE ALTA QUALIDADE PROTEICA E SEUS CRUZAMENTOS. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n. 1, p. 45–51, 2004.

ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; WATSON, A K. **Biofuel co-products as livestock feed opportunities and challenges**. [s.l: s.n.].

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 533–50, 2013.

FOLTYN, M. et al. Effect of corn ddgs on broilers performance and meat quality. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n. 1, p. 59–64, 2013.

FREITAS, G. S.; DATHEIN, R. AS ENERGIAS RENOVÁVEIS NO BRASIL : uma avaliação acerca das implicações para o desenvolvimento socioeconômico e ambiental. **NExos Econômicos**, v. 7, p. 71–94, 2013.

GANI, A.; SM, W.; FA, M. Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 3, n. 3, 2012.

GEBAUER, S. K. et al. **n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits**. American Journal of Clinical Nutrition. **Anais...**2006

GIBSON, G. R. **Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept)**Clinical Nutrition, **Supplement**, 2004.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GOESER, J. P.; HOFFMAN, P. C.; COMBS, D. K. Modification of a rumen fluid priming technique for measuring in vitro neutral detergent fiber digestibility. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 8, p. 3842–8, 2009.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable. **Science**, v. 315, n. September, p. 808–810, 2007.

GUNSTONE, F. D. **Vegetable Oils in Food Technology**. [s.l: s.n.].

GYLLING, H.; MIETTINEN, T. A. **Cholesterol absorption: influence of body weight and the role of plant sterols**.**Curr Atheroscler Rep**, 2005a. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16256005>

GYLLING, H.; MIETTINEN, T. A. The effect of plant stanol- and sterol-enriched foods on lipid

metabolism, serum lipids and coronary heart disease. **Annals of clinical biochemistry**, v. 42, n. Pt 4, p. 254–63, 2005b.

HABBEN, J. E. et al. Elongation factor 1 alpha concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8640–8644, 1995.

HADDAD, Y.; BENET, J. C.; ABECASSIS, J. A rapid general method for appraising the rheological properties of the starchy endosperm of cereal grains. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 673–676, 1998.

HERTEL, T. W.; TYNER, W. E.; BIRUR, D. K. The global impacts of biofuel mandates. **Energy Journal**, v. 31, n. 1, p. 75–100, 2010.

HETTINGA, W. G. et al. Understanding the reductions in US corn ethanol production costs: An experience curve approach. **Energy Policy**, v. 37, n. 1, p. 190–203, 2009.

HILL, J. et al. Environmental , economic , and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 103, p. 11206–11210, 2006.

JAMIN, F. F.; FLORES, R. A. Effect of additional separation and grinding on the chemical and physical properties of selected corn dry-milled streams. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 166–170, 1998.

KAWAKUBO, M. et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 1003–6, 2004.

KIM, S.; DALE, B. E. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: Nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 5, p. 475–489, 2005.

KLEINSCHMIT, D. H. et al. Evaluation of various sources of corn dried distillers grains plus solubles for lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 12, p. 4784–4794, 2006.

KRÄMER-ALBERS, E. et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins : Trophic support for axons ? p. 1446–1461, 2007.

LAMSAL, B. P.; PATHIRAPONG, P.; RAKSHIT, S. Microbial growth and modification of corn distillers dried grains with solubles during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 553–559, 2012.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 1–18, 2002.

LIM, C.; LI, E.; KLESIUS, P. H. Distiller's dried grains with solubles as an alternative protein source in diets of tilapia. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, n. 4, p. 172–178, 2011.

LIU, K.; HAN, J. Changes in mineral concentrations and phosphorus profile during dry-grind processing of corn into ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3110–3118, 2011.

LOCATELLI, S.; BERARDO, N. Original Paper Open Access Chemical composition and phytosterols profile of degermed maize products derived from wet and dry milling. 2014.

MENDONÇA, A. F. DE et al. Minerals : the Importance of Dietary Use of Ruminants. **Agropecuária**

Científica No Semi-Árido, v. v.07, n. 1, p. 01–13, 2011.

MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA, B. Matriz Energética Nacional 2030. **Vasa**, p. 254, 2008.

MOGODINIYAI KASMAEI, K.; HOLTENIUS, K. Phosphorus net absorption in dairy cows subjected to abomasal infusion of inorganic phosphorus - a pilot study. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 599–603, 2013.

MOREAU, R. A.; POWELL, M. J.; HICKS, K. B. Extraction and Quantitative Analysis of Oil from Commercial Corn Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2149–2154, 1996.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVA, A.; MONTANE, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate polymers**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2007.

NUEZ ORTÍN, W. G.; YU, P. Nutrient variation and availability of wheat DDGS, corn DDGS and blend DDGS from bioethanol plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 10, p. 1754–1761, 2009.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855–867, 2006.

PEREIRA JUNIOR, J. B.; FERNANDES, K. G.; MÜLLER, R. C. S.; NÓBREGA, J. A.; PALHETA, I. C. DETERMINAÇÃO DIRETA DE Ca, Mg, Mn E Zn EM AMOSTRAS DE LEITE DE BÚFALA DA ILHA DE MARAJÓ POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS). **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333–2335, 2009.

PIMENTEL, D. Ethanol fuels: Energy balance, economics, and environmental impacts are negative. **Natural Resources Research**, v. 12, n. 2, p. 127–134, 2003.

RAJAEI, A.; BARZEGAR, M.; YAMINI, Y. Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3–4, p. 401–405, 2005.

RAUSCH, K. D.; BELYEA, R. L. The future of coproducts from corn processing. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 128, p. 47–86, 2006.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. 2013 Ethanol Industry Outlook - Battling for the Barrel. **ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK**, p. 29, 2013.

ROBINSON, P. H.; KARGES, K.; GIBSON, M. L. Nutritional evaluation of four co-product feedstuffs from the motor fuel ethanol distillation industry in the Midwestern USA. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 3–4, p. 345–352, 2008.

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E. Two-stage hydrothermal processing of wheat (*triticum aestivum*) bran for the production of feruloylated arabinoxylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6427–6432, 2010a.

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E. Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1613–1618, 2010b.

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E.; LIU, S. X. Utilisation of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 6, p. 915–924, 2010.

SAMALA, ADITYA; SRINIVASAN, RADHAKRISHNAN ; YADAV, M. Food and Bioproducts Processing Comparison of xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of fibers separated from ground corn flour and DDGS. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. April, p. 354–364, 2014.

SAMALA, A. et al. Xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of corn fiber separated from ddgs. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 3038–3050, 2012.

SHONE, R. A. Resíduo Seco De Destilaria Com Solúveis (Ddgs) Na Alimentação De Frangos De Corte. **Dissertação**, p. 57, 2015.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: The industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171–192, 2001.

SILES, L.; CELA, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Phytochemistry Vitamin E analyses in seeds reveal a dominant presence of tocotrienols over tocopherols in the Arecaceae family. **Phytochemistry**, v. 95, p. 207–214, 2013.

SILVA, J. R. DA; NETTO, D. P.; SCUSSEL, V. M. Grãos secos de destilaria com solúveis , aplicação em alimentos e segurança : Revisão. **Pubvet**, v. 10, n. 3, p. 257–270, 2016.

SILVA, R. L. DA et al. Valor nutritivo de alimentos energéticos para a tilápia-do-nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 566–577, 2016.

SINGH, J. et al. Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 387–393, 2003.

SINGH, V. et al. Recovery of fiber in the corn dry-grind ethanol process: A feedstock for valuable coproducts. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 868–872, 1999.

SPIEHS, M. J. et al. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Nutrient. p. 2639–2645, 2002.

SPIEHS, M. J.; WHITNEY, M. H.; SHURSON, G. C. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2639–2645, 2002.

SRINIVASAN, R. et al. Separation of Fiber from Distillers Dried Grains with Solubles (DDGS) Using Sieving and Elutriation. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 528, 2005.

SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock: Fourth edition**. [s.l: s.n.].

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review** **BioResources**, 2007.

THEANDER, O; AMAN, P; WESTERLUND, E; ANDERSSON, R. P. D. Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues, Uronic Acid Residues, and Klason Lignin (The Uppsala Method):

Collaborative Study. n. 3, 1995.

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **estudos avançados**, v. 26, p. 249–260, 2011.

USDA. Oil Crops Outlook. **Outlook**, v. OCS-12-k, n. November, p. 1–17, 2012.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Grain: World Markets and Trade. **Office of Global Analysis**, p. 1–56, 2015.

WANG, L. et al. Comparison of supercritical CO₂ and hexane extraction of lipids from sorghum distillers grains. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 6, p. 567–574, 2007.

WANG, L.; WELLER, C. L. **Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants** *Trends in Food Science and Technology*, 2006.

WANG, X. et al. Quantitative Trait Locus Mapping of Loci Influencing Elongation Factor 1 α Content in Maize Endosperm 1. v. 125, n. March, p. 1271–1282, 2001.

WINKLER, J. K. et al. Phytosterol and tocopherol components in extracts of corn distiller's dried grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6482–6486, 2007.

XU, W.; REDDY, N.; YANG, Y. An acidic method of zein extraction from DDGS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6279–6284, 2007.

XU, W.; REDDY, N.; YANG, Y. Extraction, characterization and potential applications of cellulose in corn kernels and Distillers' dried grains with solubles (DDGS). **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 521–527, 2009.

XUE, Y. et al. **Production and some properties of the thermostable feruloyl esterase and xylanase from *Bacillus pumilus*** *African Journal of Biotechnology*, 2012.

Y. POMERANZ, C. R. MARTIN, D. D. TRAYLOR, AND F. S. L. Corn hardness determination.pdf. **Cereal Chemistry**, v. 61, p. 147–150, 1984.

YANG, J. et al. Production and in Vitro fermentation of soluble, non-digestible, feruloylated oligo- and polysaccharides from maize and wheat brans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 159–166, 2014.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: Chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, n. 1, p. 63–75, 2003.

YUAN, X.; WANG, J.; YAO, H. Production of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from *Bacillus subtilis*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 484–492, 2006.

9 APÊNDICE

Página 44. Tabela 6 - Caracterização das proteínas presentes no DDGS

Número de acesso	Nome da proteína
Q946W0_MAIZE	15kD beta zein OS=Zea mays GN=zp15 PE=2 SV=1
B4G197_MAIZE	16.9 kDa class I heat shock protein 1 OS=Zea mays GN=hsp 17.2 PE=2 SV=1
B6SIX0_MAIZE	16.9 kDa class I heat shock protein 1 OS=Zea mays GN=LOC100280576 PE=2 SV=1
B6TDB5_MAIZE	17.4 kDa class I heat shock protein 3 OS=Zea mays GN=IDPC175 PE=2 SV=1
B4F976_MAIZE	17.4 kDa class I heat shock protein 3 OS=Zea mays GN=LOC100191552 PE=2 SV=1
Q946V8_MAIZE	19kD alpha zein D1 OS=Zea mays GN=az19D1 PE=2 SV=1
Q946V7_MAIZE	19kD alpha zein D2 OS=Zea mays GN=az19D2 PE=2 SV=1
B4FZB0_MAIZE	1-Cys peroxiredoxin PER1 OS=Zea mays GN=PER1 PE=2 SV=1
REHY_MAIZE	1-Cys peroxiredoxin PER1 OS=Zea mays GN=PER1 PE=2 SV=1
A0A096S4W1_MAIZE	1-Cys peroxiredoxin PER1 OS=Zea mays GN=PER1 PE=4 SV=1
Q9SYT3_MAIZE	22kD alpha zein 5 OS=Zea mays GN=azs22-12 PE=2 SV=1
O48966_MAIZE	22-kDa alpha zein 4 OS=Zea mays GN=azs22-4 PE=2 SV=1
K7V6D0_MAIZE	2C-type protein phosphatase protein OS=Zea mays GN=PP2C5 PE=2 SV=1
C0PIH6_MAIZE	Aldose 1-epimerase OS=Zea mays GN=LOC100383712 PE=2 SV=1
B4FS06_MAIZE	Alkaline/neutral invertase OS=Zea mays GN=Zm.38902 PE=2 SV=1
B6SLF6_MAIZE	Antimicrobial peptide MBP-1 OS=Zea mays GN=LOC100274918 PE=2 SV=1
MBP1_MAIZE	Antimicrobial peptide MBP-1 OS=Zea mays PE=1 SV=1
K7VB51_MAIZE	Carnitine racemase like protein OS=Zea mays GN=Zm.132891 PE=4 SV=1
K7TTJ0_MAIZE	Class IV heat shock protein OS=Zea mays GN=Zm.32438 PE=3 SV=1
B6UGN8_MAIZE	Cysteine proteinase inhibitor OS=Zea mays PE=2 SV=1

A6XER2_MAIZE	Defensin OS=Zea mays GN=pdc1 PE=2 SV=1
DEF2_MAIZE	Defensin-like protein 2 OS=Zea mays PE=1 SV=1
DHN1_MAIZE	Dehydrin DHN1 OS=Zea mays GN=DHN1 PE=1 SV=2
B4G1G1_MAIZE	Desiccation-related protein PCC13-62 OS=Zea mays GN=LOC100282997 PE=2 SV=1
O50018_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=EF1-A PE=2 SV=1
EF1A_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=EF1A PE=3 SV=1
B6UHJ4_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=elf*-uaz7c01f12 PE=2 SV=1
A0A0B4J3C2_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=elfa3 PE=3 SV=1
B6TWN7_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=LOC100284707 PE=2 SV=1
K7UUB7_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=Zm.118723 PE=3 SV=1
C4JA47_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=Zm.122391 PE=2 SV=1
K7VU19_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=Zm.70437 PE=3 SV=1
B6SKA7_MAIZE	Elongation factor 1-alpha OS=Zea mays GN=Zm.85733 PE=2 SV=1
B6SI37_MAIZE	Embryonic abundant protein 1 OS=Zea mays GN=esp1 PE=2 SV=1
B6T8E4_MAIZE	Embryonic abundant protein 1 OS=Zea mays GN=Zm.80960 PE=2 SV=1
B4FFN2_MAIZE	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase OS=Zea mays GN=AY110330 PE=2 SV=1
B4FUT3_MAIZE	Germin-like protein subfamily 1 member 17 OS=Zea mays GN=LOC100273345 PE=2 SV=1
GLB1_MAIZE	Globulin-1 S allele OS=Zea mays GN=GLB1 PE=1 SV=2
Q947C0_MAIZE	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Zea mays GN=Brittle-2 PE=2 SV=1
Q3SAE4_MAIZE	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Zea mays GN=gpm823 PE=2 SV=1
Q947B9_MAIZE	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Zea mays GN=Zm.312 PE=3 SV=1
GLGS_MAIZE	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit (Fragment) OS=Zea mays GN=GLG1 PE=2 SV=1
G3PC1_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1_cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC1 PE=2 SV=2

G3PC2_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2_ cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC2 PE=2 SV=1
G3PC3_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3_ cytosolic OS=Zea mays GN=GAPC3 PE=2 SV=1
B4FQW6_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=GAPC2 PE=2 SV=1
A0A096T366_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=GAPC2 PE=3 SV=1
K7UGF5_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=GAPC3 PE=3 SV=1
C4JBS8_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=LOC542367 PE=2 SV=1
K7U1H6_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=LOC542367 PE=3 SV=1
K7UBU0_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=LOC542367 PE=3 SV=1
K7UBU3_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=LOC542367 PE=3 SV=1
K7US90_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=LOC542367 PE=3 SV=1
A0A096T094_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Zea mays GN=Zm.159709 PE=3 SV=1
SSG1_MAIZE	Granule-bound starch synthase 1_ chloroplastic/amyloplastic OS=Zea mays GN=WAXY PE=3 SV=1
Q946V1_MAIZE	Hageman factor inhibitor OS=Zea mays GN=LOC100101522 PE=2 SV=1
B4FJK0_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=gpm729 PE=2 SV=1
A0A096S5H2_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=gpm729 PE=3 SV=1
B4FH55_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=gpm81a PE=2 SV=1
B4FMH5_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=his2a1 PE=2 SV=1
C0HIB6_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=his2a1 PE=2 SV=1
B4FIA6_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100194327 PE=2 SV=1
A0A096SJC6_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100194327 PE=3 SV=1
A0A096SJC7_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100194327 PE=3 SV=1
B4FXB2_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100273753 PE=2 SV=1

B4FZ86_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100274138 PE=2 SV=1
B6T101_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=LOC100501512 PE=2 SV=1
B4FGE3_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=pco070432b PE=2 SV=1
B4FQ57_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=pco070432b PE=2 SV=1
B4FWW3_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=pco099353 PE=2 SV=1
B4G237_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=pco099353 PE=2 SV=1
A0A096TUV6_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=Zm.13002 PE=3 SV=1
K7TNS0_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=Zm.16740 PE=3 SV=1
K7TYE5_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=Zm.16740 PE=3 SV=1
B6T543_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=Zm.6778 PE=2 SV=1
A0A096QJB5_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays GN=Zm.6778 PE=3 SV=1
B6SJU3_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays PE=2 SV=1
B6SYW4_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays PE=2 SV=1
H2A_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays PE=2 SV=1
A0A096RQ70_MAIZE	Histone H2A OS=Zea mays PE=3 SV=1
B4F7S2_MAIZE	Jasmonate-induced protein OS=Zea mays GN=LOC100191141 PE=2 SV=1
EMB5_MAIZE	Late embryogenesis abundant protein EMB564 OS=Zea mays PE=2 SV=1
Q946V2_MAIZE	Legumin 1 OS=Zea mays GN=leg1 PE=2 SV=1
B4FU21_MAIZE	Myosin-like protein OS=Zea mays GN=LOC100273257 PE=2 SV=1
B6SGP7_MAIZE	Non-specific lipid-transfer protein OS=Zea mays GN=plt1 PE=2 SV=1
NLTP_MAIZE	Non-specific lipid-transfer protein OS=Zea mays PE=1 SV=1
O24583_MAIZE	Non-specific lipid-transfer protein OS=Zea mays PE=2 SV=1
A0A096PWV0_MAIZE	Non-specific lipid-transfer protein OS=Zea mays PE=3 SV=1
C0HHC4_MAIZE	Nucleoside diphosphate kinase OS=Zea mays GN=LOC100381602 PE=2 SV=1
A0A096S8D2_MAIZE	Nucleoside diphosphate kinase OS=Zea mays GN=LOC100381602 PE=3 SV=1

B4FK49_MAIZE	Nucleoside diphosphate kinase OS=Zea mays GN=LOC100384342 PE=2 SV=1
A0A096T1S3_MAIZE	Nucleoside diphosphate kinase OS=Zea mays GN=LOC100384342 PE=3 SV=1
B6SI42_MAIZE	Oleosin OS=Zea mays GN=LOC100280594 PE=2 SV=1
B6SIZ2_MAIZE	Oleosin OS=Zea mays GN=LOC100280642 PE=2 SV=1
B4FJ41_MAIZE	Oleosin OS=Zea mays GN=Zm.2098 PE=2 SV=1
OLEO1_MAIZE	Oleosin Zm-I OS=Zea mays GN=OLE16 PE=2 SV=2
OLEO3_MAIZE	Oleosin Zm-II OS=Zea mays GN=OLE18 PE=1 SV=1
A0A096RM05_MAIZE	Polyadenylate-binding protein OS=Zea mays GN=LOC100381794 PE=3 SV=1
A0A096RM06_MAIZE	Polyadenylate-binding protein OS=Zea mays GN=LOC100381794 PE=3 SV=1
NLTP2_MAIZE	Probable non-specific lipid-transfer protein 2 OS=Zea mays PE=1 SV=1
K7W4Y6_MAIZE	Protein SUR2 OS=Zea mays GN=Zm.4051 PE=4 SV=1
A3KLI1_MAIZE	RAB17 protein OS=Zea mays GN=rab17 PE=2 SV=1
K7TQC8_MAIZE	Seed maturation protein OS=Zea mays GN=ZEAMMB73_789084 PE=4 SV=1
K7VDS4_MAIZE	Shrunken1 OS=Zea mays GN=SH-1 PE=4 SV=1
B6TJX4_MAIZE	SnRK1-interacting protein 1 OS=Zea mays GN=Zm.83376 PE=2 SV=1
K7VKB3_MAIZE	Squalene monooxygenase OS=Zea mays GN=pc0148653 PE=4 SV=1
Q5NKP6_MAIZE	Starch synthase_ chloroplastic/amyloplastic OS=Zea mays GN=9C20.5 PE=3 SV=1
K7V7C6_MAIZE	Starch synthase_ chloroplastic/amyloplastic OS=Zea mays GN=ZEAMMB73_617956 PE=3 SV=1
K7W719_MAIZE	Starch synthase_ chloroplastic/amyloplastic OS=Zea mays GN=ZEAMMB73_617956 PE=3 SV=1
B6UI15_MAIZE	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B OS=Zea mays GN=LOC100286333 PE=2 SV=1
SUS1_MAIZE	Sucrose synthase 1 OS=Zea mays GN=SH-1 PE=2 SV=1
K7V5Z8_MAIZE	Sucrose synthase OS=Zea mays GN=SH-1 PE=3 SV=1
K7VDR8_MAIZE	Sucrose synthase OS=Zea mays GN=SH-1

	PE=3 SV=1	
K7VR61_MAIZE	Sucrose synthase OS=Zea mays GN=SH-1 PE=3 SV=1	
TPIS_MAIZE	Triosephosphate isomerase_ cytosolic OS=Zea mays PE=3 SV=3	
ITRF_MAIZE	Trypsin/factor XIIA inhibitor OS=Zea mays PE=1 SV=2	
K7TJE4_MAIZE	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Zea mays GN=ZEAMMB73_295043 PE=4 SV=1	
A0A096TBG1_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=elf*- uaz7c01f12 PE=4 SV=1	
C0PGM3_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=glb1 PE=2 SV=1	
A0A096QZ47_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=glb1 PE=4 SV=1	
K7U972_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100125637 PE=4 SV=1	
A0A096Q6D8_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100191141 PE=4 SV=1	
C0PDX9_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274142 PE=2 SV=1	
K7UY61_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274142 PE=4 SV=1	
K7VY13_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274142 PE=4 SV=1	
B4G087_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274324 PE=2 SV=1	
B4G0K5_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274379 PE=2 SV=1	
C4J722_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100274379 PE=2 SV=1	
K7VEC7_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100282446 PE=4 SV=1	
A0A096S8D4_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100381602 PE=3 SV=1	
A0A096RM08_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100381794 PE=4 SV=1	
A0A096T1S5_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100384342 PE=4 SV=1	
B6TEW3_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100502218 PE=2 SV=1	
C0HII8_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100502218 PE=2 SV=1	
A0A096RUZ6_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100502218 PE=3 SV=1	
A0A096RUZ9_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100502218 PE=3 SV=1	
A0A096RV00_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays GN=LOC100502218 PE=3 SV=1	

K7W1L0_MAIZE	Uncharacterized protein GN=pco148653 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7U1D3_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_349181 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7VSN3_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_617956 PE=3 SV=1	OS=Zea	mays
K7VF76_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_617956 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7TYS6_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_637697 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7V8Z7_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_812864 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7VGG6_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_908707 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7VXP0_MAIZE	Uncharacterized protein GN=ZEAMMB73_908707 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
B6UH30_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.10151 PE=2 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096RI54_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.123994 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
C0P8J4_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.124713 PE=2 SV=1	OS=Zea	mays
K7TYS3_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.136630 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096TQ66_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.138802 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096TQ67_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.138802 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096TZI5_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.158494 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
B4FFK9_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.162886 PE=2 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096TTU9_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.25021 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096TTV0_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.25021 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096SS38_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.312 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096QW22_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.32997 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
K7UB06_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.38902 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
Q7M1Z8_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.3896 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays
A0A096PY91_MAIZE	Uncharacterized protein	OS=Zea	mays

	GN=Zm.43695 PE=4 SV=1			
A0A096PYI0_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.43695 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096UIZ3_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.64418 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
K7V2X6_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.83376 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
K7W2Q4_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.83376 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
K7TF29_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.8805 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
K7W272_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.92932 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096SS17_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.94009 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096SS18_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.94009 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096SS19_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.94009 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096SS20_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.94009 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096SS21_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zm.94009 PE=4 SV=1	OS=Zea	mays	
C0PNL4_MAIZE	Uncharacterized protein GN=Zp15 PE=2 SV=1	OS=Zea	mays	
A0A096TQ77_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=3
A0A0B4J320_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=3
A0A096PH50_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096PJ67_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096PJX3_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096QQ56_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096R830_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096SSG5_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096SY32_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096T6I3_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096TQD8_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4
A0A096TZ44_MAIZE	Uncharacterized protein SV=1	OS=Zea	mays	PE=4

A0A096U527_MAIZE	Uncharacterized protein OS=Zea mays PE=4 SV=1
ZEAA_MAIZE	Zein-alpha 19D1 OS=Zea mays PE=2 SV=1
ZEAB_MAIZE	Zein-alpha PZ19.1 (Fragment) OS=Zea mays PE=2 SV=1
ZEAZ_MAIZE	Zein-alpha PZ22.3 OS=Zea mays PE=2 SV=1
ZEAL_MAIZE	Zein-alpha Z4 OS=Zea mays PE=3 SV=2
ZEB1_MAIZE	Zein-beta OS=Zea mays PE=2 SV=1