

**INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CAMPUS VENDA NOVA DO IMIGRANTE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**JÚLIO DIAS CAMPOREZI
SANDY RODRIGUES DIAS**

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO VIA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA**

**VENDA NOVA DO IMIGRANTE-ES
2021**

JÚLIO DIAS CAMPOREZI
SANDY RODRIGUES DIAS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO VIA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenadoria do Curso de Bacharelado em
Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto
Federal do Espírito Santo, como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharel em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Soares Cardoso

VENDA NOVA DO IMIGRANTE-ES
2021

JÚLIO DIAS CAMPOREZI
SANDY RODRIGUES DIAS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO VIA SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEA**

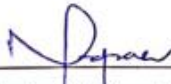
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenadoria do Curso de Bacharelado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em: 07 de maio de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA



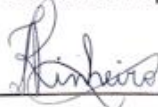
Prof. Dr. Wilton Soares Cardoso
Instituto Federal do Espírito Santo (orientador)



Dr.ª. Maria Cristina Dias Paes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Prof. Dr. Deusélio Bassini Fioresi
Instituto Federal do Espírito Santo



Prof.ª Dr.ª. Flávia de Abreu Pinheiro
Instituto Federal do Espírito Santo

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
(Biblioteca do Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Venda Nova do Imigrante)

C198p Camporezi, Júlio Dias.

Produção de etanol de milho via sacarificação e fermentação
simultânea / Júlio Dias Camporezi, Sandy Rodrigues Dias. – 2021.

47f. : il. ; 30 cm

Orientador: Wilton Soares Cardoso.

Monografia (Graduação) – Instituto Federal do Espírito Santo, Campus
Venda Nova do Imigrante, Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, 2021.

1. Biocombustíveis. 2. Sacarificação. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Hidrólise. 5. Tecnologia de alimentos. I. Dias, Sandy Rodrigues. II. Cardoso,
Wilton Soares. III. Instituto Federal do Espírito Santo. IV. Título.

CDD: 662.6

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, por nos acompanhar e iluminar nesse longo caminho.

Aos nossos pais, Eliane Dias Camporezi e Hélio Camporezi *In memoriam* (Júlio) e Marluce Rodrigues da Silveira e Carlos Renato Dias da Silva (Sandy), por todas orações, incentivos e apoios.

Ao Wilton Soares Cardoso, pela orientação, confiança, as várias oportunidades a nós concedidas, pelo companheirismo e principalmente pelos ensinamentos e orientações que tornaram a pesquisa mais completa.

À Flávia Pinheiro, por todo apoio, paciência e conhecimentos concedidos. Agradecemos por cada palavra de apoio e por cada incentivo.

Ao professor Deusélio Bassini Fioresi, pela ajuda ao desenvolver a estatística aplicada nos dados, melhorando a visualização dos resultados da análise.

À Dr^a. Maria Cristina Paes Dias e a Embrapa Milho e Sorgo por ter cedido as amostras de milho e as enzimas para a realização dos experimentos.

Aos amigos de curso, Vinícius, Welder e Mariana por cada momento de risada e momentos de diversão vividos nesses 5 anos de curso, o que tornou os dias mais leves. Agradecemos a todos.

Obrigado!

RESUMO

No contexto atual, com grande demanda por combustíveis para a indústria e automóveis, a produção de biocombustíveis, como o etanol, a partir de fontes renováveis são temas de grande interesse. No Brasil, o etanol de milho começa a ser produzido no Centro-Oeste e hoje corresponde a 2% do etanol brasileiro. Na produção de etanol de milho, a introdução de novos genótipos é um dos fatores de sucesso do programa. O uso do milho para a produção de etanol é uma das linhas de melhoramento conduzidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na unidade Embrapa Milho e Sorgo. Assim, com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento da pesquisa e o estudo da obtenção de etanol de cultivares com melhor perfil tecnológico, o presente trabalho propõe a aplicação de um protocolo para a produção de etanol de milho seco, envolvendo etapas de sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Nesse contexto, 36 genótipos de milho da Embrapa Milho e Sorgo foram avaliados para a produção de etanol. Para o processo SSF, foram utilizados Liquozyme® Supra 2.2X (α -amilase) e Spirizyme Fuel Ultra XHS (glucoamilase) e a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. O resultado final obteve rendimento médio de 33,02% entre as 36 amostras. Destacando uma amostra que atingiu quase 500 L.ton⁻¹. Separando as amostras em grupos por similaridade, utilizando um dendrograma, foram obtidos 3 grupos, onde o grupo 1 obteve a maior média (42,8%) de rendimento seco, o grupo 2 (34,2%) e o grupo 3 com a menor média (31%).

Palavras-chave: Bioetanol, Sacarificação, *Saccharomyces cerevisiae*, Hidrólise enzimática, Rendimento.

ABSTRACT

In the current context, the high demand for fuels for industry and automobiles, and the production of biofuels from renewable sources are topics of great interest. The first plant to produce corn ethanol in Brazil was Usimat, in 2012, operating on flex technology. The first plant with exclusive production of ethanol from corn (technology known as full) in Brazil is the company FS Bioenergia. In Brazil, corn ethanol begins to be produced in the Midwest. Currently, corn ethanol corresponds to 2% of Brazilian ethanol. In 2017, 305 million liters were produced in 4 factories in the states of Goiás and Mato Grosso. In the production of ethanol from starchy sources such as corn, the introduction of new genotypes is one of the factors for the success of the program. In this context, this work aims to apply the simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) to 36 genotypes of Embrapa Corn and Sorghum for the production of corn ethanol. For the SSF process, Liquozyme® Supra 2.2X (α -amylase) and Spirizyme Fuel Ultra XHS (glucoamylase) and the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* were used. The final result obtained an ethanol yield from the 36 samples with an average (33.02%). In the comparison with the starch content in the samples, it can be observed that there was no correlation between the starch content and the ethanol yield (%) on a dry basis. Separating the samples into groups by similarity, using a dendrogram, we obtained 3 groups, where group 1 obtained the highest average (42.8%) of dry yield, group 2 (34.2%) and group 3 with the lowest average (31%).

Keywords: Bioethanol, Saccharification, *Saccharomyces cerevisiae*, Enzymatic hydrolysis, Yield.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ATP - Adenosina trifosfato

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTE - Chumbo tetraetila

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GEE - Gases do Efeito Estufa

IUBMB - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NAD⁺ - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (oxidado)

NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (reduzido)

ONU - Organização das Nações Unidas

P_i - Fosfato Inorgânico

Proálcool - Programa Nacional do Alcool

RNA - Ácido ribonucleico

SHF - Hidrólise e fermentação separada

SSF - Sacarificação e Fermentação Simultânea

USDA - United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 ETANOL.....	14
3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO.....	15
3.3 MILHO.....	16
3.4 O AMIDO.....	18
3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO	20
3.6 SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF).....	21
3.7 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAIS	25
4.2 PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF)	25
4.2.1 Determinação de etanol	25
4.2.2 Determinação do rendimento em álcool das amostras.....	26
4.3 CÁLCULO DE POTENCIAL PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO	27
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS AMOSTRAS.....	27
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6 CONCLUSÃO	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO A	43

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um dos principais desafios enfrentados no século XXI é conciliar a grande demanda energética para suprir as necessidades industriais e de transporte com a sustentabilidade. Os combustíveis fósseis são apontados como os principais causadores da emissão de gases de efeito estufa (GEE) como o dióxido de carbono e metano, ocasionando mudanças climáticas, gerando impacto significativo no ecossistema (CINELLI, 2012).

Nos dias atuais, a substituição progressiva de combustíveis fósseis por fontes de energia alternativa proveniente de biomassa renovável (biocombustíveis) tem sido vista como considerável contribuinte para o desenvolvimento sustentável da sociedade ambiental, amenizando os problemas ambientais (RAGAUSKAS *et al.*, 2006).

Os biocombustíveis trata-se de fonte renovável de energia utilizada através da queima de biomassa ou de seus derivados, tais como o etanol (álcool para combustível), o biodiesel, o biogás, o óleo vegetal, dentre outros. Esses biocombustíveis contribuem para o desenvolvimento sustentável e eficaz para os problemas ambientais, e, introduzem melhores condições agroeconômicas (ECKERT, 2016).

Dentre os biocombustíveis produzidos pelo Brasil, o etanol é o principal destaque. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América. Muitos avanços científicos e tecnológicos ocorridos nos últimos 40 anos sobre os processos de fermentação e microbiologia contribuíram imensuravelmente para a evolução e ampliação das indústrias de etanol no Brasil, tanto como obtenção do etanol de primeira quanto o de segunda geração. Através desses estudos, novas tecnologias estão disponíveis para a produção de etanol de cana-de-açúcar, milho, beterraba sacarina, sorgo e outras matérias-primas, levando à redução de período de entressafra (LOPES *et al.*, 2016).

A tecnologia envolvida na obtenção do etanol envolve a fermentação de açúcares fermentescíveis como a glicose e a sacarose, utilizando em sua maioria, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação. Os açúcares como a frutose e glicose presentes nas matérias-primas são convertidos em etanol e CO₂

formando ainda outros produtos como o glicerol, ácido acético e succínico, furfural e outros (WANG *et al*, 2016).

Para o etanol de fontes amiláceas, como milho, é necessário que o amido passe pelo processo de hidrólise, seja essa realizada com ácidos ou enzimas, para converter o amido em açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática possui maior eficiência que a hidrólise ácida por apresentar grande especificidade em quebrar as ligações dos componentes majoritários do amido desfavorecer a baixa formação de subprodutos tóxicos favorecendo a fermentação (CASTRO, 2011).

A utilização do milho para a produção de etanol constitui uma das linhas de pesquisa conduzidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na unidade Embrapa Milho e Sorgo. Visando contribuir para o desenvolvimento da pesquisa e dando continuidade ao estudo de obtenção do etanol de cultivares de milho com melhor perfil tecnológico para a obtenção deste bioproduto, o presente trabalho propõe a aplicação de um protocolo para a produção de etanol de milho via seca, envolvendo etapas de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), de diferentes genótipos desenvolvidos pela Embrapa Milho e Sorgo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar um protocolo para a produção de etanol via seca de diferentes genótipos de milho, envolvendo etapas de sacarificação e fermentação simultânea (SSF).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo das amostras por via seca;
- Implementar a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) das amostras para produção de etanol de milho;
- Determinar o teor alcoólico dos fermentados de cada amostra;
- Apresentar os rendimentos (%) e $L \cdot ton^{-1}$ dos diferentes genótipos de milho processados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ETANOL

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, o etanol, também conhecido com álcool etílico é definido como uma substância produzida via fermentação, destilatória ou sintética, sua fórmula molecular (C_2H_6O) possui em sua cadeia carbônica uma hidroxila (OH). É um biocombustível usado em motores de combustão interna com ignição por centelha (Ciclo Otto), substituindo principalmente a gasolina e em contraponto a outros combustíveis fósseis (ANP, 2019).

O etanol como forma de combustível pode ser utilizado como etanol hidratado ou anidro. O etanol hidratado, 99% de teor alcóolico, é utilizado como substituto total da gasolina, ou seja, utilizado diretamente no tanque do veículo. Já o etanol anidro, 99,5% de teor alcóolico é utilizado como aditivo à gasolina, tendo substituído o chumbo tetraetila (CTE) por razões ambientais e também realizando uma melhora nos motores (EPE, 2005).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (BRASIL, 2020), o Brasil registrou na safra de 2019/2020 a produção de 35,6 bilhões de litros de etanol derivados das matérias-primas de cana-de-açúcar e do milho, alcançando assim, a maior produção de etanol da história brasileira. Esses valores representam um acréscimo 7,5% em comparação a 2018/19. Da produção total de etanol, estima-se que 34 bilhões de litros de etanol foram provenientes da cana-de-açúcar, representando um aumento de 5,1% quando comparado com a safra passada. A produção de etanol de milho, apresentou uma produção de 1,6 bilhão de litros, mais que o dobro da safra de 2018/2019 que foi de 791,4 milhões de litros.

A produção de etanol no continente europeu utiliza várias matérias-primas, como trigo, cevada, centeio, milho, beterraba açucareira e vinhos (uvas), a maioria das plantas europeias de produção de etanol são adaptadas para obter o combustível a partir de vários tipos de cereais diferentes. Esta flexibilidade no uso de matérias-

primas permite utilizar as mesmas com menor preço no momento, reduzindo custos, e como os grãos são negociados na bolsa de valores, permite o edge, limite de preço, diminuindo o risco (RACHED, 2011).

3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO

A cana de açúcar é a principal matéria-prima para a produção de etanol no Brasil, devido às suas condições climáticas para o cultivo. Entretanto, a cana-de-açúcar possui uma entressafra definida, ocasionando em falta de matéria-prima em períodos do ano, devido a cana não poder ser armazenada (FILHO, 2009).

As usinas brasileiras, a fim de reduzir custos operacionais, estão se adaptando para utilização de outras matérias primas para operar no período entressafra, permitindo que as usinas operem o ano todo. A utilização de matérias-primas amiláceas para a produção de etanol está consolidada no mercado mundial, principalmente a utilização de milho. Devido ao grande volume de milho produzido no Brasil, principalmente no estado do Mato Grosso. As usinas do setor de produção de etanol visando aumentar os lucros e diminuir o período de entressafra, adaptaram suas indústrias para a produção de etanol de milho. A primeira usina a produzir etanol de milho no Brasil foi a Usimat, no ano de 2012, operando na tecnologia *flex* (usina que opera com cana e milho) (AZEVEDO, 2018). Atualmente, a Usimat deixou de operar a usina no modelo *flex* e passou para a tecnologia *full flex*, operando simultaneamente cana-de-açúcar e milho.

A primeira usina com fabricação exclusiva de etanol a partir do milho (tecnologia conhecida como *full*) no Brasil é a empresa FS Bioenergia, com produção aproximada de 530 milhões de litros (FS BIOENERGIA, 2018).

Além das tecnologias de produção de etanol *full* e *flex*, a tecnologia total *flex* ou *full flex* está sendo implantada no país e com alta tendência de mercado. A constante busca pela eficiência e maior produção de etanol vem crescendo cada dia mais, o sistema *full flex*, trata-se de introduzir duas unidades industriais ao mesmo tempo, processando cana e milho de forma independente e simultânea, sem a necessidade de paralisar o processamento do milho para a obtenção de etanol com a chegada da safra da cana-de-açúcar (MILLENIUM BIOENERGIA, 2021).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol de milho, atrás apenas dos Estados Unidos. O etanol de milho no Brasil tem apresentado aumento significativo na produção nacional (Tabela 1) (EPE, 2019).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o levantamento da produção de etanol de milho na safra de 2020/2021, bateu o recorde de produção de 2,7 bilhões de litros na temporada, obtendo 61,1% de avanço, comparado ao ano anterior (BRASIL, 2021).

Tabela 1 - Produção brasileira de etanol de milho

Ano	Milhões de litros
2013	11
2014	71
2015	121
2016	201
2017	413
2018	720

Fonte: Adaptada da Empresa de Pesquisa Energética (2019).

De acordo com Manochio (2014), uma tonelada de milho é suficiente para produzir cerca de 460 litros de etanol anidro. Na safra 2018/2019, a FS-Bioenergia, em seu primeiro ano completo de operação, processou 625,4 mil toneladas de milho, tendo uma média de, aproximadamente, 414 litros de etanol por tonelada de milho processada.

Em um relatório publicado pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2021), as usinas de etanol de milho produziram 2.567.343 litros de etanol utilizando o milho como matéria-prima em 2020/21 (abril-março), o equivalente a quase 9% da produção de etanol no Brasil.

3.3 MILHO

O milho (*Zea mays*), originário do México, é um cereal produzido em quase todos os continentes, sendo extensivamente utilizado na alimentação humana, na ração

animal e também na indústria de alta tecnologia, como a produção de biocombustíveis, filmes e embalagens biodegradáveis (PAES, 2006).

O milho é a cultura mais onipresente, com a terceira maior extensão no mundo. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018), a produção mundial de milho está concentrada em alguns países, com destaque na produção para os Estados Unidos, China e Brasil. Outros países que vêm ganhando destaque na produção: Argentina, Ucrânia e União Européia (Tabela 2). A produção dessa cultura agrícola mundial dos países pioneiros ultrapassam uma produção de 1,076 bilhão de toneladas.

Tabela 2 - Principais países produtores de milho e total mundial (em mil toneladas)

Países	2019/2020
Estados Unidos	352.441
China	254.000
Brasil	101.000
União Européia-27	64.200
Argentina	50.000
Ucrânia	34.000

Fonte: Adaptado de USDA (2020).

O beneficiamento do milho para as indústrias ocorre através dos processos de moagem seca e úmida. Desses processos, resultam subprodutos utilizados tanto nas indústrias alimentícias, ração animal e farmacêutica, como farinha de milho, amido, óleo, farinha desengordurada e outros. Em sua composição, em base seca, o percentual de amido é de aproximadamente 72%, proteínas 9,5%, fibra 9% e, durante o processamento industrial rende aproximadamente 5% de seu peso na forma de óleo (REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015).

O processo de moagem por via seca é caracterizada pelo processo de fracionamento físico do grão, onde ocorre a separação em degerminadores do endosperma e gérmen, sem o uso de água. O milho é degerminado e moído, originando produtos, como: fubá, canjica, farelos para ração e óleo refinado (CARDOSO *et al.*, 2011).

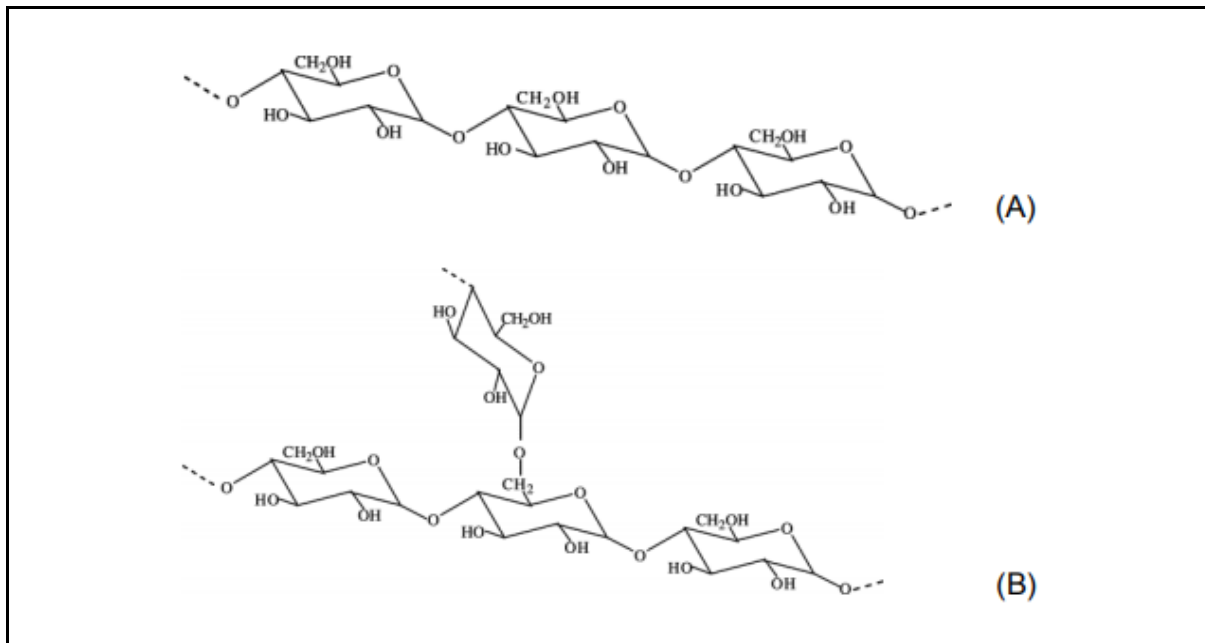
Já no processo de moagem por via úmida, o principal processo envolvido é a maceração. Em tanques com água nas temperaturas entre 50 a 54 °C e pH baixo são adicionadas pequenas quantidades de SO₂ e ácido láctico, amaciando e hidratando o grão facilitando a separação de seus componentes. Através do processo de moagem úmida, o principal produto obtido é o amido (CARDOSO *et al.*, 2020; ELYEA, 2006).

3.4 O AMIDO

O amido (C₆H₁₀O₅)_n é um importante polímero natural presente nas plantas. As características e aspectos físicos, químicos e nutricionais do amido o destacam dos demais alimentos na cadeia nutricional. Ele constitui o mais abundante carboidrato presente nas reservas das plantas e pode ser encontrado em diversos vegetais como frutas, cereais, raízes, tubérculos e outras hortaliças. No entanto, a nível industrial, a extração de amido ocorre apenas em cereais, raízes e tubérculos, por ser mais abundante nos mesmos (REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015).

O amido é o carboidrato com maior presença na alimentação dos seres humanos, caracterizando cerca de 80 a 90% dos polissacarídeos da dieta (WHO/FAO, 1998). Os grânulos de amido são formados por unidades de α-D-glicose com ligações glicosídicas que compõem dois polímeros principais: amilose e amilopectina. Amilose possui ligações glicosídicas α-D-(1,4) com poucas ligações α-(1,6) (entre 0,1% e 2,2%), originando uma cadeia linear (Figura 1A). Já a amilopectina possui ligações glicosídicas α-D-(1,6) formando uma estrutura ramificada (Figura 1B) (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Figura 1 - Estrutura molecular (A) Amilose e (B) Amilopectina



Fonte: Adaptado por Muralikrishna *et al.* (2005).

As proporções de amilose e amilopectina são diferentes em relação às fontes, ou seja, essas proporções são diferentes em relação à fonte vegetal (DAMODARAN; PARKIN, 2018). A proporção de amilose no amido de milho varia de 25 a 28%, enquanto a proporção na mandioca é em média 17% (WEBBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009). A proporção de amilopectina na maioria dos amidos é de 60 a 90% (COPELAND *et al.*, 2009).

Segundo a World Health Organization/Food and Agriculture Organization (WHO/FAO, 1998), os grânulos de amido, quando em contato com água fria, incham pouco entre 10 a 20%, sendo um processo reversível se passar pelo método de secagem. Esses grânulos absorvem água em suas regiões amorfas. Entretanto, quando aquecidos incham perdendo a birrefringência, com fusão de cristais, esse processo é irreversível. Como a cristalinidade do grânulo é rompida, as moléculas de água formam pontes de hidrogênio entre a amilose e a amilopectina, levando ao inchamento e solubilidade (SINGH *et al.*, 2003).

O amido modificado é utilizado para realçar ou inibir determinadas características, para usos específicos como alterar a consistência, estabilidade, palatabilidade e também gelificar ou turvar. As formas mais comuns para o processo de modificação são: hidrólise ácida, oxidação, esterificação e *cross-linking*. Já o amido resistente é

aquele que resiste à dispersão em água em temperaturas próximas à ebulição e também à ação de pulanase e amilase pancreática (ENGLYST *et al.*, 1982).

3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO

Os processos presentes nos produtos manufatureiros, geralmente envolvem reações químicas. Essas reações geralmente são catalisadas por catalisadores químicos ou por enzimas, essas por sua vez, são mais viáveis para a indústria.

As enzimas são moléculas que aceleram a velocidade dos processos químicos e desempenham fundamentais reações bioquímicas no metabolismo dos seres vivos (MONTEIRO; SILVA, 2009). Quase todos os processos biológicos requerem em algum ponto, a atividade de uma enzima. Elas são capazes de suceder transformações químicas muito específicas e complexas nas condições fisiológicas apropriadas de pressão atmosférica, pH e temperatura em meio aquoso (HOLLIDAY *et al.*, 2007).

A hidrólise enzimática é uma reação química onde se utiliza enzimas classificadas como hidrolases, que possuem a ação de hidrolisar e utiliza o meio aquoso para realizar a quebra de moléculas, convertendo o amido em açúcares fermentescíveis. A hidrólise do amido é feita principalmente em duas etapas, a etapa de liquefação e a etapa de sacarificação (ALMEIDA, 2017).

Na etapa de liquefação, o amido em meio aquoso com o auxílio da enzima α -amilase atua sobre os grãos de amido rompendo as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$), formando dextrinas e oligossacarídeos. Esse processo ocorre próximo à faixa de gelatinização do amido. No caso do amido de milho tem uma faixa de gelatinização de 62 a 70 °C (SCIPIONI, 2011).

A α -amilase é uma enzima com alto valor agregado, muito utilizada em processamentos como fermentações, processamentos como de alimentos, utilizada na indústria têxtil, em amidos e outros. São obtidas principalmente através dos microrganismos: *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* (BON *et al.*, 2008). A enzima α -amilase (E.C. 3.2.1.1.) pertence à classe das hidrolases e é classificada

no grupo das endoamilases. Ela hidrolisa as ligações glicosídicas ($\alpha 1\rightarrow 4$) do amido, produzindo oligossacarídeos, maltose, dextrinas e pequenas quantidades de D-glicose. Para converter o amido totalmente em glicose é necessário um conjunto de enzimas agindo simultaneamente (NELSON; COX, 2018; CINELLI, 2012).

A α -amilase é caracterizada por atuar na rápida diminuição da opacidade e viscosidade do amido, é também conhecida como enzima de liquefação e dextrinizante (SCIPIONI, 2011). Segundo Ramachandran *et al.* (2004), a α -amilase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* possui pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 50 °C. As enzimas α -amilase são fortemente inibidas por íons como Cu^{2+} , Co^{2+} e também pelo Ba^{2+} e pouco afetada por Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Sr^{2+} (CORDEIRO *et al.*, 2002).

A segunda etapa, consiste na sacarificação dessas dextrinas, para a obtenção de glicose. Esta reação é catalisada principalmente pela enzima glucoamilase. A glucoamilase (E.C.3.2.1.3), também conhecida como amiloglicosidase, pertence à classe das hidrolases, que faz parte do grupo das exoamilases. Ela atua nas extremidades não redutoras do amido, sobre as ligações ($\alpha 1\rightarrow 4$), e em menor velocidade nas ligações ($\alpha 1\rightarrow 6$), liberando unidades de β -glicose (NELSON; COX, 2018), além de ser conhecida como enzima sacarificante.

A glucoamilase é de origem fúngica, produzida principalmente pelo *Aspergillus niger*. De acordo com Ono *et al.* (1988), glucoamilases produzidas por *Aspergillus niger* têm pH e temperatura ótima de 4,0 a 5,0 e 55 a 65 °C, respectivamente. Já as produzidas pelo *Aspergillus awamori* tem pH ótimo 5,0 e temperatura ótima de 70 °C (NEGI; BERNEJEE, 2009). Segundo Pires *et al.* (2002), a presença dos íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} ocasionam um aumento na atividade enzimática amilolítica, enquanto que íons de Cu^{2+} ocasionam diminuição. Com o aumento da atividade da glucoamilase, há maior conversão de glicose, o que ocasiona maior rendimento de etanol.

3.6 SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF)

A obtenção de etanol através de matérias-primas amiláceas podem ser obtidas através dos processos de hidrólise enzimática de sacarificação e fermentação

separada (SHF) e de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

No processo de SHF, as etapas de hidrólise e fermentação ocorrem separadamente. A etapa de liquefação ocorre nas temperaturas de 80 a 90 °C por cerca de 45 a 90 minutos com a adição da enzima α -amilase (BOTHAST; SCHLICHER, 2005). Após a etapa de liquefação, ocorre a sacarificação, onde a enzima glucoamilase é adicionada e converte oligossacarídeos em glicose. É realizada nas temperaturas de 60 a 65 °C por 45 a 90 minutos em pH 4,5 (KELSALL; LYONS, 2003). Após a sacarificação, o mosto é resfriado nas temperaturas entre 30 a 35 °C, em seguida, a levedura é adicionada para o início da fermentação (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006).

O processo de SSF combina a hidrólise enzimática da dextrina e a fermentação dos produtos gerados da hidrólise. Neste caso, a glicose é consumida pelas leveduras durante a fermentação para a produção de etanol, fermentando o substrato em produto (CASTRO, 2011).

Segundo Lima (2001), para que haja a reação das enzimas com o material amiláceo presente no milho, é necessário que o mesmo se encontre na forma de goma, ou seja, gelificado, passando, assim, por uma série de operações que irão compor o processo de SSF. As operações que os grãos passam são: moagem, pesagem, liquefação, sacarificação e fermentação. Após os grãos de milho serem moídos em granulometria de 4 a 5 mm, seguindo para o processo de liquefação por 3 horas. Ao obter a goma, procede-se o processo de sacarificação, que consiste na adição de enzimas amilolíticas para a obtenção de maltose e dextrinas. O meio favorável para a sacarificação são pH 5,5 a 5,7 e temperatura entre 40 e 60°C. Durante a sacarificação, processo que são produzidos os açúcares, adiciona-se o microrganismo fermentador no mesmo reator que estão sendo produzidos os açúcares. Assim, a glicose é fermentada em etanol rapidamente, reduzindo os inibidores e os custos para a produção do álcool.

Estudos sobre a sacarificação e fermentação simultânea foram realizados por Karimi *et al.* (2006) sobre a palha de arroz. Durante o processo, a palha de arroz foi pré-tratada com ácido diluído e foi fermentada com três diferentes microrganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor indicus* e *Rhizopus oryzae*. O maior rendimento

obtido foi pelo microrganismo *Rhizopus oryzae* que apresentou 74 e 68% de eficiência em etanol.

Silva *et al.* (2018), avaliaram a fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de *Ananas comosus* através da sacarificação e fermentação simultânea, atingindo uma produção de 7,12% de etanol (v/v) em 24 horas de fermentação, com taxa de conversão de 75,53%.

3.7 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

O processo de fermentação alcoólica é definido como o conjunto de reações bioquímicas, realizadas em ambiente anaeróbio na presença de açúcar e microrganismos que convertem o açúcar em álcool e CO₂ (PINTO *et al.*, 2013).

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção de etanol por via fermentativa. A fermentação alcoólica acontece no interior dos microrganismos. Essas leveduras são responsáveis em converter açúcares fermentescíveis como a glicose, sacarose, frutose, manose, rafinose e maltotriose em etanol. Dentre essas leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se como a espécie mais explorada comercialmente na produção de etanol (CINELLI, 2012).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais comumente empregada, utilizada principalmente na indústria alimentícia. Suas principais vantagens de utilização são: (i) alta velocidade fermentativa; (ii) facilidade de multiplicação e obtenção; (iii) grande formação de produtos nutritivos; (iv) resistência a meios ácidos; (v) elevada conversão de açúcares em etanol e (vi) pequena produção de glicerol (SANTOS, 2010). Além disso, tem-se a alta capacidade fermentativa utilizada nas indústrias de biocombustíveis, devido a alta tolerância ao etanol e outros inibidores gerados durante o processo fermentativo e à capacidade de se desenvolver em ambiente anaeróbico, sendo estas características de processos de fermentação em larga escala (KNAUF; KRAUS, 2006).

A glicólise é a principal via metabólica para a produção de etanol. Esta via consiste em uma sequência de 10 reações catalisadas por enzimas que ocorre em duas etapas, a fase preparatória e a fase de pagamento, onde uma molécula de glicose é

convertida através dessas reações em duas moléculas de piruvato, que acontece no citoplasma celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000).

O piruvato quando convertido em baixa pressão de oxigênio (hipoxia) ou em meio anaeróbico, pode ser convertido em lactato (fermentação láctica), segunda via principal da glicólise e, em etanol e CO₂ (fermentação alcoólica), terceira principal via da glicólise (NELSON; COX, 2018).

O processo de conversão do piruvato a etanol e CO₂ ocorre em duas etapas. Na etapa I, ocorre a descarboxilação do piruvato, que é uma reação irreversível catalisada pela piruvato-descarboxilase. Pelo fato de ser uma descarboxilação simples, não envolve a oxidação do piruvato. Para que haja a descarboxilação do piruvato a piruvato-descarboxilase requer Mg²⁺, que contém uma coenzima fortemente ligada, a coenzima tiamina-pirofosfato. A piruvato-descarboxilase está presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em outros microrganismos fermentadores de glicose em etanol (NELSON; COX, 2018).

Na etapa II, pela ação da enzima álcool-desidrogenase o acetaldeído é reduzido a etanol, com o poder redutor fornecido pelo NADH derivado da desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato. O NAD⁺ é regenerado na etapa II e fornece um saldo de duas ATP's em ganho através de cada molécula de glicose metabolizada (NELSON; COX, 2018; BARNETT; ENTIAN, 2014; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). A equação geral dos produtos finais da fermentação etanólica são:



Segundo Lima *et al.* (2001), a faixa de temperatura ótima para a produção de etanol, em escala industrial, é de 26 a 35°C e a faixa de pH de 4,5 a 5,5.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Química e Pesquisa e Desenvolvimento do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, campus Venda Nova do Imigrante.

4.1 MATERIAIS

Grãos de milho híbridos elite do programa de melhoramento genético da safra 2016/2017 foram fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG.

As enzimas utilizadas foram a Liquozyme® Supra 2.2X e Spirizyme Fuel Ultra XHS cedidas pela empresa Novozyme.

A levedura utilizada para a fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann).

4.2 PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF)

Para o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) seguiu-se a metodologia de Cardoso *et al.* (2020).

4.2.1 Determinação de etanol

A determinação do teor alcoólico foi realizada com o auxílio de um picnômetro, por meio da densidade relativa segundo o protocolo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014), do material fermentado que passou por uma destilação.

O picnômetro (limpo e seco) foi pesado vazio, depois pesado com água destilada a 20 °C e, em seguida, com o destilado a 20 °C. O controle de temperatura foi feito com banho de gelo, em que a temperatura é monitorada constantemente com o auxílio de um termômetro digital.

A densidade relativa é dada pela equação (1):

$$Densidade\ Relativa = \frac{m_{pic+amostra} - m_{pic.vazio}}{m_{pic+H_2O} - m_{pic.vazio}} \quad (1)$$

onde,

$m_{\text{pic.+amostra}}$ = massa do picnômetro mais amostra destilada

$m_{\text{pic. vazio}}$ = massa do picnômetro vazio

$m_{\text{pic+H}_2\text{O}}$ = massa do picnômetro com água destilada

O teor de etanol do destilado (volume de 37,5 mL) foi determinado utilizando a Tabela 6 (ANEXO A) de porcentagem de álcool em volume a 20 °C (% v/v) correspondente à densidade relativa (ZENEBAON *et al.*, 2008) da equação (1).

4.2.2 Determinação do rendimento em álcool das amostras

Depois de determinado o teor de etanol do destilado, transformou-se esta concentração (v/v) em massa (g) de álcool no destilado pela equação (2). Conforme descrito por Cardoso *et al.* (2020).

$$m = \frac{t * v * d}{100} \quad (2)$$

onde:

m = massa de etanol (g)

t = teor de etanol do destilado (% v/v) encontrado na Tabela 7 (ANEXO A)

v = volume de amostra destilada (valor fixo) = 37,5 mL

d = densidade do etanol a 20 °C = 0,7893 g mL⁻¹

Assim, o rendimento de etanol é calculado pela equação (3):

$$R_{bu} = \left(\frac{m}{m_{\text{amostra}} - m_{\text{resíduo}}} \right) * 100 \quad (3)$$

Onde:

R_{bu} = rendimento final de etanol (%) em base úmida

m = massa de etanol (g)

m_{amostra} = massa da amostra (g)

$m_{\text{resíduo}}$ = massa do resíduo (g)

Esse rendimento final foi expresso em base úmida (b.u.).

Nesta etapa também foi feita a correção dos rendimentos com relação ao teor de umidade da amostra de milho moída, com intuito de diminuir os erros causados por amostras com diferentes teores de umidade.

Assim, o rendimento final foi convertido em base seca (b.s.), conforme equação (4):

$$R_{bs} = \left[\frac{R_{bu}}{1 - (u/100)} \right] \quad (4)$$

onde:

R_{bs} = rendimento final de etanol (%) em base seca ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)

R_{bu} = rendimento final de etanol (%) em base úmida

u = teor de água da amostra (%)

4.3 CÁLCULO DE POTENCIAL PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO

Para obtenção do potencial de produção de etanol de litros por toneladas foram realizados os cálculos de acordo com a equação (6):

$$P(L.t^{-1}) = \frac{R_{bs}}{d} * 10 \quad (6)$$

$P(L.t^{-1})$ = Potencial de litros por tonelada;

R_{bs} = Rendimento em base (%);

d = densidade do etanol de $0,7893 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DAS AMOSTRAS

Para a determinação de umidade seguiu-se a metodologia de Zenebon *et al.* (2008), com modificações.

Os cadinhos de porcelana foram secos durante uma hora em estufa a 105°C , resfriados em dessecador e depois pesados, anotando-se a massa. Nestes cadinhos foram adicionados $3,5 \pm 0,05 \text{ g}$ da amostra moída, e novamente pesados.

Em seguida, os cadinhos com as amostras foram levados em estufa a 105°C por 24 horas, resfriados e pesado.

Assim, a umidade foi calculada conforme a equação (5):

$$U(\%) = \frac{P_{c+a} - P_{c+a(s)}}{P_{c+a} - P_{cv}} \quad (5)$$

onde:

P_{c+a} = Peso (g) do cadinho mais amostra;

$P_{c+a(s)}$ = Peso (g) do cadinho e da amostra seco (24h);

P_{cv} = Peso (g) do cadinho vazio.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais do rendimento (% e $L \cdot ton^{-1}$) das amostras foram apresentados pela média mais ou menos o desvio padrão.

Adicionalmente, para classificar as amostras em relação à variável rendimento, os dados foram analisados estatisticamente por análise multivariada pelo método de aglomeração usando a distância Euclidiana como medida de similaridade entre os grupos e métodos hierárquicos para obtenção de um dendograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios, realizados durante os anos de 2019 e 2020, foram executados pelo método via seca, utilizando o método de sacarificação e fermentação simultânea, de 36 diferentes genótipos de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Os resultados do rendimento em base seca (%), toneladas/litros e a estimativa de toneladas por hectare da produção de etanol de milho, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias do rendimento de etanol de milho e potencial de produção

Amostras	Rendimento Base seca (%)	Potencial (L ton⁻¹)
101	36,580 ± 1,626	463,448
102	42,803 ± 2,033	542,288
103	33,209 ± 0,757	420,737
104	34,864 ± 1,846	441,705
105	31,139 ± 2,171	394,511
106	32,657 ± 1,632	413,750
107	33,571 ± 1,224	425,323
108	36,062 ± 0,804	456,891
109	37,023 ± 1,814	469,056
110	32,399 ± 1,336	410,480
111	29,782 ± 0,708	377,315
112	35,000 ± 1,596	443,433
113	34,876 ± 0,946	441,858
114	30,821 ± 1,163	390,486
115	29,222 ± 1,063	370,225
116	28,063 ± 1,139	355,549
117	28,761 ± 0,278	364,389
118	33,753 ± 0,631	427,638
119	32,189 ± 0,545	407,818
120	29,102 ± 0,748	368,703
121	32,781 ± 0,306	415,318
122	34,983 ± 0,919	443,221

123	31,303 ± 0,381	396,592
124	28,869 ± 1,643	365,753
125	33,063 ± 0,690	418,892
126	31,970 ± 1,321	405,047
127	33,667 ± 1,020	426,543
128	26,110 ± 0,600	330,799
129	33,875 ± 0,861	429,181
130	36,886 ± 0,938	467,332
131	33,789 ± 0,540	428,087
132	32,210 ± 0,264	408,084
133	33,673 ± 1,571	426,622
134	32,890 ± 0,377	416,693
135	37,087 ± 0,908	469,872
136	33,774 ± 0,891	427,897
Média	33,022	418,376

Como observado na Tabela 3 o menor rendimento foi da amostra 128 com potencial de 330,799 L.ton⁻¹ de milho, já a amostra 102 obteve maior rendimento, com 542,288 L.ton⁻¹ de milho, destacando-se entre as demais amostras estudadas.

Segundo Silva *et al.* (2020), na produção de usinas *flex* o rendimento de etanol de milho é em média de 399,27 L.ton⁻¹. O rendimento descrito pela UNICA (2017) e CONAB (2012), foi de 410 e 370 L.ton⁻¹ de milho, respectivamente. Cerca de 65% das amostras deste estudo obtiveram rendimento acima do relatado pelos autores acima. Milanez *et al.* (2014), apresentou um rendimento de etanol de 439 L.ton⁻¹ de milho.

Para se comparar os dados de milho com os dados relatados da produção de etanol de cana-de-açúcar, geralmente estimado em L.ha (hectare), foi realizado cálculo utilizando a produtividade do milho em 5,986 kg.ha⁻¹ de acordo com Diário do Comércio (2020), obtendo-se a média de 2504,4 L.ha⁻¹.

Quando se analisa os resultados por ano, os valores de rendimento do milho e da cana-de-açúcar se assemelham, porque o rendimento em etanol das linhagens avaliadas terá uma média de 5000 L.ha⁻¹ por ano, pois ciclo de produtividade do

milho é de até 6 meses, onde a colheita é realizada duas vezes no ano. Apesar de que essas duas safras no Brasil não são equivalentes em volume de produção (apresentam a mesma produtividade), diferente dos Estados Unidos, dado que a safra de inverno (safrinha ou 2ª safra) tem uma menor produção (cerca de 30% da 1ª safra). A cana-de-açúcar passa por 5 cortes no período de 6 anos (MANOCHIO *et al.*, 2017). Segundo Milanez *et al.*, (2015), a produção de etanol de cana-de-açúcar pode variar de 6000 a 7000 L.ha⁻¹ na produção anual, e de acordo com Zhu *et al.* (2015) mandioca (cassava) de 1650 a 2200 L.ha⁻¹.

Eckert (2016) apresentou o rendimento de etanol obtido de um híbrido de milho com a média de produção de 2897,3 L.ha⁻¹. Em Milanez *et al.* (2014) a produção de etanol no Brasil alcança 3800 L.ha⁻¹ por ano (produtividade do milho de 4,33 ton.ha⁻¹). Se utilizarmos os genótipos de maior rendimento, por exemplo o 102, tem-se o potencial de produção de até 3246,1 L.ha⁻¹.

A fermentação do milho moído por via-seca é um processo bioquímico muito complexo que envolve várias condições diferentes. O tipo de milho, enzimas, cepas de levedura e condições de fermentação afetam o rendimento final do etanol. Para o milho, os diferentes componentes (óleo, proteína, conteúdo mineral) desempenham um papel importante, além do amido, para atingir a concentração final de etanol máxima (MURTHY *et al.*, 2009).

As variações nas produções entre as amostras do estudo ou relatadas por diferentes autores, podem está relacionadas a partes do processo, como moagem não suficiente ou peneiras inapropriada (NAIDU *et al.*, 2007), falhas na liquefação e sacarificação, perdas na fermentação e a determinação do etanol, por densidade, que oferece inúmeros erros.

Os processos de moagem das amostras é um ponto que pode impactar na eficiência do processo. Em estudos realizados por Naidu *et al.* (2007), onde eles testaram diferentes a granulometrias no processo de moagem para a obtenção de etanol de milho. As partículas foram testadas nos tamanhos de 0,5, 2, 3, 4 e 5 mm. O tamanho que obteve melhor rendimento foi a de 0,5 mm, garantindo maior quantidade de sólidos solúveis.

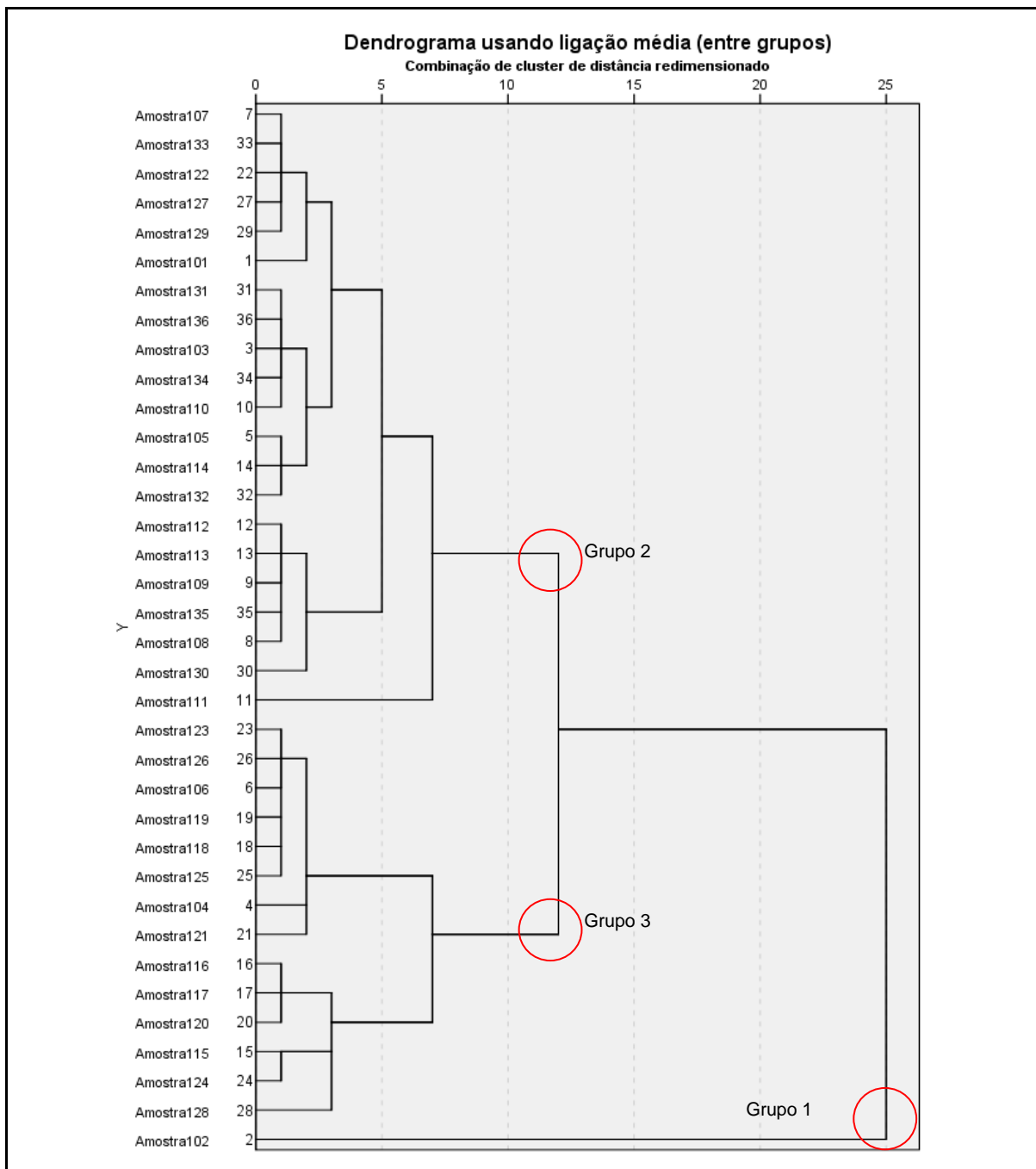
As perdas ou variações de rendimento também podem ocorrer durante a fermentação alcoólica, que podem ser explicadas em parte, pelo metabolismo das leveduras (Efeito Pasteur). As perdas na fermentação também podem ocorrer por evaporação do etanol e ou contaminações bacterianas (FERNANDES, 2011; VIÉGAS, 2011; PINHEIRO, 2004).

Somente as perdas de etanol por evaporação em fermentações industriais são estimadas em 1% a 3% do etanol produzido (OUGH e AMERINE, 1986), e essas perdas são estimadas em 10% a 30% do total de perdas de rendimento observadas (CARE *et al*, 1992).

A contaminação das fermentações de bioetanol com bactérias lácticas e leveduras selvagens é um problema industrial significativo, causando perda de produção de 2 a 22% (BECKNER, IVEY; PHISTER, 2011). Neste estudo foi adicionado antibióticos para evitar a contaminação por bactérias.

A técnica multivariada "Análise de Agrupamentos" foi empregada para reduzir o número de amostras em detrimento de uma única variável, o rendimento, e assim classificar as amostras em grupos por similaridade, representado pelo dendograma abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Dendrograma usando ligação média (entre grupos)



Fonte: Autoria própria (2021)

O dendrograma dividiu as amostras em 3 grupos, considerando a distância euclidiana. O grupo com menor rendimento foi o grupo 3, com média de 31,00% de rendimento em etanol. Dentro do grupo 2, a média de produção de etanol foi maior que a do grupo 3, com 34,2% de rendimento em etanol. O destaque é a amostra 102 com 42,8% de rendimento em etanol, e o dendrograma ressalta isso, deixando-a sozinha no grupo 1.

6 CONCLUSÃO

No processamento do milho via seca e através da metodologia de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) utilizada produziu-se etanol a partir dos 36 genótipos. Os rendimentos finais variaram de 330 a 542 L.Ton⁻¹, semelhantes aos reportados por diferentes trabalhos. Ao final dividiu-se as 36 amostras com respectivos rendimentos em 03 grupos, através de dendrograma agrupados por similaridade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, Adriana Neves Gomes de; LIMA, Bruna Gomes de Azevedo. Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional. **Revista Direito Ambiental e sociedade**, v. 6, n. 1. 2016.

BARNETT, James. A.; ENTIAN, Karl-Diter. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. **Yeast**, 22, p. 835-894, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/yea.1249>>. Acesso em: 27 maio 2020.

BAPTISTELLA, João Leonardo Corte. **Safra e safrinha: veja as diferenças, dicas e cuidados para o produtor**. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/safra-e-safrinha/?gclid=Cj0KCQjw7pKFBhDUARIsAFUoMDawPuvWmuGCQSGcmyYdTQEKPOfhC5vFflbLy7SLtT4z8JcnHyE90D8aAmTVEALw_wcB>. Acesso em 04 abr. 2021.

BECKNER, Margaret; IVEY, Melissa L .; PHISTER, Trevor G. Contaminação microbiana de fermentação de etanol combustível. **Cartas em Microbiologia Aplicada** , v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.

BOTHAST, Rodney; SCHLICHER, Martha. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.1, p.19-25. 2005.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. **Conab divulga pela primeira vez dados sobre a produção de etanol de milho**. Brasília, Distrito Federal, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2881-conab-divulga-pela-primeira-vez-dados-sobre-a-producao-de-etanol-de-milho-2>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. País confirma recorde na produção de etanol: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20>>. Acesso em: 17 mai. 2021.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Superintendência: Regional de Mato. Processo (simplificado) de produção de ETANOL de MILHO; 2012. Disponível em:http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_28_12_11_19_007a-12_-_>. Acesso em: 09 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Grau alcoólico real. **Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres**, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**, ed. 1, 2009. 399 p.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis. **Empresa de Pesquisa Energética - EPE**. Brasília - DF, 2019.

CARDOSO, Wilton Soares *et al.* Indústria do milho. **Embrapa Amazônia Ocidental- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011. p. 176-195.

CARDOSO, Wilton Soares *et al.* Metodologia científica: determinação do rendimento de produção de etanol de grãos de milho por via seca em escala laboratorial. **Embrapa Milho e Sorgo-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2020.

CASTRO, Aline Machado *et al.* Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 3, p. 291-302, 2011.

CINELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Dissertação. Rio de Janeiro - RJ, 2012. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/76012725-Producao-de-etanol-acoplada-a-processos-de-separacao-por-membranas-bernardo-alves-cinelli.html>>. Acesso em: 22 mar. 2020.

COPELAND, Les *et al.* Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p.1527-1534. 2009.

CORDEIRO, Carlos Alberto Martins *et al.* Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57- 61, 2002.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. **Química de alimentos de Fennema**. 5 ed, Artmed Editora, 2018.

DIÁRIO DO COMÉRCIO. Produção de milho no País deve somar 115,5 mil de toneladas, 2020. Disponível em: <<https://diariodocomercio.com.br/agronegocio/producao-de-milho-no-pais-deve-somar-1155-mi-de-toneladas>>. Acessado em: 09 abr. /2021.

ECKERT, Caroline Thaís *et al.* Avaliação da Produção de Etanol a partir de distintos Híbridos de Milho na Região Oeste do Paraná. 2016.

ENGLYST, Hans N. *et al.* Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.107, p.307-318, 1982.

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. Potencial de Redução de Emissões de CO₂ em Projetos de Produção e Uso de Biocombustíveis. **Relatório do Governo Federal-Ministério de Minas e Energia (MME/SPE), Convênio**, n. 039, p. 66, 2005.

FERNANDES, Antonio Carlos. Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar. **STAB: Piracicaba, SP, Brasil**, 2011.

FS BIOENERGIA. FS começa a construir nova usina de etanol de milho. Disponível em: <<https://www.fs.agr.br/noticias/fs-bioenergia-comeca-a-construir-nova-usina-de-etanol-de-milho/>>. Acesso em: 13 mai. 2021

FS Bioenergia. **Relatório Anual de Sustentabilidade Safra 2018/2019**. Disponível em: <<http://fsbioenergia.com.br/wp-content/uploads/2019/10/fspt.pdf>> Acesso em 28 mai. 2020.

HOLLIDAY, Gemma L *et al.* The chemistry of protein catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 5, p. 1261-1277, 2007.

KARIMI, Keikhosro *et al.* Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 138-144, 2006.

KELSALL, Dave; LYONS, Pearse. Grain dry milling and cooking procedures: extracting sugars in preparation for fermentation. In: (Ed.). **The Alcohol Textbook**. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: Nottingham University Press, 2003.

KNAUF, M.; KRAUS, K. Specific yeasts developed for modern ethanol production. **Sugar Industry**, v. 131, p. 753-758, 2006.

KWIATKOWSKI, Jason *et al.* Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. **Industrial Crops and Products**, v.23, n.3, p.288-296. 2006.

LIMA, Urgel de Almeida *et al.* **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LOPES, Mario Lucio *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

MADIGAN, Michael T. *et al.* Nutrition and metabolism. **Brock Biology of Microbiology**. 9th ed. Editora Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000.

MANOCHIO, Carolina *et al.* Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743-755, 2017.

MARTÍN, Jenny C.; LÓPEZ, Elizabeth. Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa-amilasa. **Revista Colombiana de Química**, v. 38, n. 3, 2009.

MILANEZ, Artur Yabe *et al.* A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. Rev **BNDES**, 2014.

MILLENIUM BIOENERGIA. Millenium Bioenergia Total flex. Disponível em: <<https://www.milleniumbioenergia.com.br/>>. Acesso em: 13 mai. 2021.

MONTEIRO, Valdirene Neves; SILVA, Roberto do Nascimento. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MURTHY, Ganti S. et al. Evaluation of a dry corn fractionation process for ethanol production with different hybrids. **Industrial Crops and Products**. v. 29, p. 67–72, 2009.

NAIDU, K., SINGH, V., JOHNSTON, D.B., RAUSCH, K.D., TUMBLESÓN, M.E. Effects of Ground Corn Particle Size on Ethanol Yield and Thin Stillage Soluble Solids. **Cereal Chemistry**. v.84, n.1, p. 6-9. 2007.

NEGI, Sangeeta; BANERJEE, Rintu. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 443-448, 2009.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. ed. 6, p. 544 à 580, Artmed Editora, 2014.

ONO, Kazuhisa *et al.* Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. **Agricultural and biological chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1699-1706, 1988.

PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

PINHEIRO, Rita. **Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras**. 2004. 292 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, 2004.

PINTO, Andrade A. *et al.* Separation of *Saccharomyces cerevisiae* from alcoholic fermentation broth by two commercial hydrocyclones. **Separation and Purification Technology**. v. 120, p. 69–77. 2013.

PIRES, T. C. P.; VEIGA, E. M.; FINARDI FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa. (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Food Science and Technology**, v. 22, p. 278-284, 2002.

RAMCHANDRAN, Divya *et al.* Seasonal variability in ethanol concentrations from a dry grind fermentation operation associated with incoming corn variability. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 155-160, 2015.

REGINATO-D'ACRE, Marisa Aparecida Bismara; SPOTO, Marta Helena Fillet; CASTELUCCI, Ana Carolina Leme. Processamento e industrialização do milho para alimentação humana. **Visão agrícola N° 13**, p. 138-140, 2015.

SANTOS, Fernando. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas**. Viçosa, MG. c. 15, p. 401-437, 2010.

SCIPIONI, Gustavo Callegari *et al.* **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum L.*) utilizando enzimas amilolíticas**. Santa Maria - RS, 2011.

SILVA, Franciele Maria Borges da; NASCIMENTO, Carla Oliveira. **Análise de viabilidade da produção de etanol derivado do milho: um estudo comparativo**. [S.I.] 2017. Disponível em: <<http://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/AN%C3%81LISE%20DE%20VIABILIDADE%20DA%20PRODU%C3%87%C3%83O%20DE%20ETANOL.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2020.

SILVA, Haroldo José Torres da *et al.* Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 29, n. 4, p. 142, 2020.

SILVA, Jumelice dos S. *et al.* Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de *Ananas comosus*. **Química Nova**, v. 41, n. 10, p. 1127-1131, 2018.

SINGH, Narpinder *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 219-231, 2003.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=63>>. Acessado em: 0 abr. 2021.

USDA. United States Department of Agriculture. **Grain: World Markets and Trade**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 21 abr. 2020.

VASCONCELOS, Natália Moura de; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; ARAGÃO, Fernando Antônio de Souza. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Fortaleza, 2013.

VÁSQUEZ, Mariana Peñuela *et al.* Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136-140, p. 141-154, 2007.

VIÉGAS, Ellen Karine Diniz. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado em Ciência em Tecnologia em Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WANG, Fu. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste Biotechnol Biofuels. **Journal of Nuclear Materials**. 2016.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization. **Carbohydrates in human nutrition**. Rome: FAO, 1998, (FAO food and nutrition paper no. 66).

ZENEBO *et al.* **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

ZHAN, X. Produção de ácido láctico a partir de sorgo cozido por extrusão, 2002 , p. 589 - 593.

ZHU, Shengdong *et al.* Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. **Applied Energy**, v. 154, p. 190-196, 2015.

ANEXO A

Tabela 7 - Porcentagem de álcool em volume a 20 °C (% v/v) correspondente à densidade relativa (BRASIL, 2014).

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
1,00000	0,0	0,99632	2,5	0,99281	5,0	0,98956	7,5
0,99985	0,1	0,99618	2,6	0,99268	5,1	0,98944	7,6
0,99970	0,2	0,99603	2,7	0,99255	5,2	0,98931	7,7
0,99955	0,3	0,99589	2,8	0,99241	5,3	0,98919	7,8
0,99939	0,4	0,99574	2,9	0,99228	5,4	0,98906	7,9
0,99924	0,5	0,99560	3,0	0,99215	5,5	0,98893	8,0
0,99910	0,6	0,99546	3,1	0,99201	5,6	0,98881	8,1
0,99895	0,7	0,99531	3,2	0,99188	5,7	0,98869	8,2
0,99880	0,8	0,99517	3,3	0,99174	5,8	0,98857	8,3
0,99866	0,9	0,99503	3,4	0,99161	5,9	0,98845	8,4
0,99851	1,0	0,99489	3,5	0,99148	6,0	0,98833	8,5
0,99836	1,1	0,99475	3,6	0,99135	6,1	0,98820	8,6
0,99821	1,2	0,99461	3,7	0,99122	6,2	0,98807	8,7
0,99807	1,3	0,99447	3,8	0,99109	6,3	0,98794	8,8
0,99792	1,4	0,99433	3,9	0,99096	6,4	0,98782	8,9
0,99777	1,5	0,99419	4,0	0,99083	6,5	0,98770	9,0
0,99763	1,6	0,99405	4,1	0,99070	6,6	0,98758	9,1
0,99748	1,7	0,99391	4,2	0,99057	6,7	0,98746	9,2
0,99733	1,8	0,99377	4,3	0,99045	6,8	0,98734	9,3
0,99719	1,9	0,99363	4,4	0,99032	6,9	0,98722	9,4
0,99704	2,0	0,99349	4,5	0,99020	7,0	0,98710	9,5
0,99689	2,1	0,99336	4,6	0,99007	7,1	0,98698	9,6
0,99675	2,2	0,99322	4,7	0,98994	7,2	0,98686	9,7
0,99661	2,3	0,99308	4,8	0,98981	7,3	0,98674	9,8
0,99646	2,4	0,99295	4,9	0,98969	7,4	0,98662	9,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,98650	10,0	0,98239	13,5	0,97851	17,0	0,97478	20,5
0,98637	10,1	0,98227	13,6	0,97840	17,1	0,97467	20,6
0,98626	10,2	0,98216	13,7	0,97829	17,2	0,97456	20,7
0,98614	10,3	0,98204	13,8	0,97818	17,3	0,97445	20,8
0,98602	10,4	0,98193	13,9	0,97807	17,4	0,97435	20,9
0,98590	10,5	0,98182	14,0	0,97797	17,5	0,97424	21,0
0,98578	10,6	0,98171	14,1	0,97786	17,6	0,97414	21,1
0,98566	10,7	0,98159	14,2	0,97775	17,7	0,97404	21,2
0,98554	10,8	0,98148	14,3	0,97764	17,8	0,97393	21,3
0,98542	10,9	0,98137	14,4	0,97754	17,9	0,97382	21,4
0,98530	11,0	0,98126	14,5	0,97743	18,0	0,97371	21,5
0,98518	11,1	0,98115	14,6	0,97732	18,1	0,97360	21,6
0,98506	11,2	0,98103	14,7	0,97721	18,2	0,97350	21,7
0,98494	11,3	0,98092	14,8	0,97711	18,3	0,97339	21,8
0,98482	11,4	0,98081	14,9	0,97700	18,4	0,97328	21,9
0,98470	11,5	0,98070	15,0	0,97690	18,5	0,97317	22,0
0,98459	11,6	0,98058	15,1	0,97679	18,6	0,97306	22,1
0,98447	11,7	0,98047	15,2	0,97668	18,7	0,97295	22,2
0,98435	11,8	0,98036	15,3	0,97657	18,8	0,97285	22,3
0,98424	11,9	0,98025	15,4	0,97646	18,9	0,97274	22,4
0,98412	12,0	0,98014	15,5	0,97636	19,0	0,97263	22,5
0,98400	12,1	0,98003	15,6	0,97626	19,1	0,97252	22,6
0,98388	12,2	0,97992	15,7	0,97616	19,2	0,97241	22,7
0,98377	12,3	0,97981	15,8	0,97605	19,3	0,97230	22,8
0,98365	12,4	0,97970	15,9	0,97595	19,4	0,97219	22,9
0,98354	12,5	0,97959	16,0	0,97584	19,5	0,97208	23,0
0,98342	12,6	0,97948	16,1	0,97574	19,6	0,97197	23,1
0,98330	12,7	0,97937	16,2	0,97563	19,7	0,97185	23,2
0,98318	12,8	0,97926	16,3	0,97553	19,8	0,97174	23,3
0,98307	12,9	0,97915	16,4	0,97542	19,9	0,97163	23,4
0,98296	13,0	0,97905	16,5	0,97531	20,0	0,97152	23,5
0,98285	13,1	0,97894	16,6	0,97521	20,1	0,97141	23,6
0,98274	13,2	0,97883	16,7	0,97511	20,2	0,97130	23,7
0,98263	13,3	0,97872	16,8	0,97500	20,3	0,97118	23,8
0,98251	13,4	0,97862	16,9	0,97489	20,4	0,97107	23,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,95288	38,0	0,94728	41,5	0,94124	45,0	0,93472	48,5
0,95272	38,1	0,94711	41,6	0,94106	45,1	0,93453	48,6
0,95257	38,2	0,94695	41,7	0,94088	45,2	0,93434	48,7
0,95241	38,3	0,94678	41,8	0,94070	45,3	0,93414	48,8
0,95226	38,4	0,94662	41,9	0,94052	45,4	0,93395	48,9
0,95210	38,5	0,94645	42,0	0,94034	45,5	0,93376	49,0
0,95194	38,6	0,94628	42,1	0,94015	45,6	0,93357	49,1
0,95179	38,7	0,94611	42,2	0,93997	45,7	0,93337	49,2
0,95163	38,8	0,94594	42,3	0,93979	45,8	0,93318	49,3
0,95148	38,9	0,94577	42,4	0,93961	45,9	0,93298	49,4
0,95132	39,0	0,94560	42,5	0,93943	46,0	0,93279	49,5
0,95116	39,1	0,94543	42,6	0,93924	46,1	0,93260	49,6
0,95100	39,2	0,94526	42,7	0,93906	46,2	0,93240	49,7
0,95084	39,3	0,94509	42,8	0,93887	46,3	0,93221	49,8
0,95068	39,4	0,94492	42,9	0,93869	46,4	0,93201	49,9
0,95052	39,5	0,94475	43,0	0,93850	46,5	0,93182	50,0
0,95037	39,6	0,94458	43,1	0,93831	46,6	0,93162	50,1
0,95021	39,7	0,94440	43,2	0,93813	46,7	0,93142	50,2
0,95005	39,8	0,94423	43,3	0,93794	46,8	0,93122	50,3
0,94989	39,9	0,94405	43,4	0,93776	46,9	0,93102	50,4
0,94973	40,0	0,94388	43,5	0,93757	47,0	0,93082	50,5
0,94957	40,1	0,94371	43,6	0,93738	47,1	0,93063	50,6
0,94941	40,2	0,94353	43,7	0,93719	47,2	0,93043	50,7
0,94924	40,3	0,94336	43,8	0,93701	47,3	0,93023	50,8
0,94908	40,4	0,94318	43,9	0,93682	47,4	0,93003	50,9
0,94892	40,5	0,94301	44,0	0,93663	47,5	0,92983	51,0
0,94876	40,6	0,94283	44,1	0,93644	47,6	0,92963	51,1
0,94860	40,7	0,94266	44,2	0,93625	47,7	0,92943	51,2
0,94843	40,8	0,94248	44,3	0,93606	47,8	0,92922	51,3
0,94827	40,9	0,94230	44,4	0,93587	47,9	0,92902	51,4
0,94811	41,0	0,94213	44,5	0,93568	48,0	0,92882	51,5
0,94794	41,1	0,94195	44,6	0,93549	48,1	0,92862	51,6
0,94778	41,2	0,94177	44,7	0,93530	48,2	0,92842	51,7
0,94761	41,3	0,94159	44,8	0,93510	48,3	0,92821	51,8
0,94745	41,4	0,94142	44,9	0,93491	48,4	0,92801	51,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,92781	52,0	0,92057	55,5	0,91300	59,0	0,90507	62,5
0,92761	52,1	0,92036	55,6	0,91278	59,1	0,90484	62,6
0,92740	52,2	0,92015	55,7	0,91255	59,2	0,90461	62,7
0,92720	52,3	0,91993	55,8	0,91233	59,3	0,90438	62,8
0,92700	52,4	0,91972	55,9	0,91210	59,4	0,90415	62,9
0,92679	52,5	0,91951	56,0	0,91188	59,5	0,90392	63,0
0,92659	52,6	0,91930	56,1	0,91166	59,6	0,90369	63,1
0,92639	52,7	0,91908	56,2	0,91143	59,7	0,90346	63,2
0,92619	52,8	0,91887	56,3	0,91121	59,8	0,90323	63,3
0,92598	52,9	0,91865	56,4	0,91098	59,9	0,90300	63,4
0,92578	53,0	0,91844	56,5	0,91076	60,0	0,90276	63,5
0,92557	53,1	0,91823	56,6	0,91053	60,1	0,90253	63,6
0,92536	53,2	0,91801	56,7	0,91031	60,2	0,90230	63,7
0,92516	53,3	0,91780	56,8	0,91008	60,3	0,90207	63,8
0,92496	53,4	0,91758	56,9	0,90986	60,4	0,90184	63,9
0,92475	53,5	0,91737	57,0	0,90963	60,5	0,90161	64,0
0,92454	53,6	0,91715	57,1	0,90941	60,6	0,90137	64,1
0,92434	53,7	0,91694	57,2	0,90918	60,7	0,90114	64,2
0,92413	53,8	0,91672	57,3	0,90896	60,8	0,90091	64,3
0,92393	53,9	0,91651	57,4	0,90873	60,9	0,90067	64,4
0,92372	54,0	0,91629	57,5	0,90851	61,0	0,90043	64,5
0,92351	54,1	0,91607	57,6	0,90828	61,1	0,90020	64,6
0,92330	54,2	0,91586	57,7	0,90805	61,2	0,89997	64,7
0,92309	54,3	0,91564	57,8	0,90782	61,3	0,89973	64,8
0,92288	54,4	0,91543	57,9	0,90759	61,4	0,89950	64,9
0,92267	54,5	0,91521	58,0	0,90736	61,5	0,89926	65,0
0,92247	54,6	0,91499	58,1	0,90714	61,6	0,89902	65,1
0,92226	54,7	0,91477	58,2	0,90691	61,7	0,89879	65,2
0,92205	54,8	0,91455	58,3	0,90666	61,8	0,89855	65,3
0,92184	54,9	0,91433	58,4	0,90645	61,9	0,89831	65,4
0,92163	55,0	0,91410	58,5	0,90622	62,0	0,89807	65,5
0,92142	55,1	0,91388	58,6	0,90599	62,1	0,89784	65,6
0,92121	55,2	0,91366	58,7	0,90576	62,2	0,89760	65,7
0,92099	55,3	0,91344	58,8	0,90553	62,3	0,89736	65,8
0,92078	55,4	0,91322	58,9	0,90530	62,4	0,89713	65,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,89689	66,0	0,89401	67,2	0,89109	68,4	0,88814	69,6
0,89665	66,1	0,89376	67,3	0,89085	68,5	0,88789	69,7
0,89641	66,2	0,89352	67,4	0,89061	68,6	0,88765	69,8
0,89617	66,3	0,89328	67,5	0,89036	68,7	0,88740	69,9
0,89593	66,4	0,89304	67,6	0,89012	68,8	0,88715	70,0
0,89569	66,5	0,89280	67,7	0,88987	68,9	0,87437	75,0
0,89545	66,6	0,89255	67,8	0,88963	69,0	0,86082	80,0
0,89521	66,7	0,89231	67,9	0,88938	69,1	0,84639	85,0
0,89497	66,8	0,89207	68,0	0,88913	69,2	0,83071	90,0
0,89473	66,9	0,89183	68,1	0,88889	69,3	0,81288	95,0
0,89449	67,0	0,89158	68,2	0,88864	69,4	0,79074	100,0
0,89425	67,1	0,89134	68,3	0,88839	69,5	-	-