

**KAMILA RODRIGUES LEITE**

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE RESÍDUO DE  
MEL SILVESTRE POR FERMENTAÇÃO COM  
*ESCHERICHIA COLI***

**GUARAPUAVA-PR**

**2017**

**KAMILA RODRIGUES LEITE**

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE RESÍDUO DE MEL SILVESTRE POR  
FERMENTAÇÃO COM *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Cynthia Beatriz Furstenberger

Orientadora

Profº. Drº. Everson Prado Banczek

Co-orientador

GUARAPUAVA-PR

2017

**KAMILA RODRIGUES LEITE**

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE RESÍDUO DE MEL SILVESTRE POR  
FERMENTAÇÃO COM ESCHERICHIA COLI**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 31 de julho de 2017

Prof(a). Dr(a). Marilei de Fátima Oliveira - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Paulo Rogério Pinto Rodrigues - UNICENTRO

Prof(a). Dr(a). Cynthia Beatriz Furstenberger

Orientadora

Profº. Drº. Everson Prado Banczek

Co-orientador

GUARAPUAVA-PR

2017

### *Dedicatória*

Ao meu marido Lucas pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais Francisco Agostinho e Lúcia Elena, que dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me presentear com a gravidez do Miguel, meu primeiro filho, que fez consolidar uma família repleta de amor.

À minha família, em especial Karla (irmã) e Maria (avó) pelo incentivo.

Aos Prof. (s) Everson e Cynthia, por serem precursores de grande parte deste trabalho, exemplificando a ética e competência de ótimos profissionais e pela contínua dedicação e paciência.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABELAS.....	3
LISTA DE EQUAÇÕES.....	4
LISTA DE REAÇÕES E MECANISMOS DE REAÇÕES.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Mel.....	12
4. COMPOSIÇÃO.....	13
4.1. Propriedades do Mel.....	18
4.2. Microbiota Presente no Mel.....	20
4.3. Escherichia Coli.....	22
4.4. Fermentação.....	24
4.5. Fermentação Alcoólica.....	28
4.6. Produção e Usos Alternativos do Mel.....	31
4.7. Espectrometria no Infravermelho.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1. Avaliação dos Parâmetros Físico-Químicos:.....	37
5.2. Potencial Hidrogeniônico (pH).....	38
5.3. Açúcares Redutores (AR).....	38
5.4. Teor de açúcar na escala Brix.....	39
6. Cultivo da bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	40
7. Pasteurização.....	40
9. Quantificação do Teor de Etanol no Destilado Bruto (°GL).....	42
10. Caracterização do etanol.....	42
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
11.1. Caracterização Físico-Química.....	43
11.2. Fermentação em sistema semi anaeróbico com erlenmeyer.....	45
11.3. Teor de álcool das amostras em função do tempo de fermentação.....	47
11.4. Comparação dos métodos de fermentação.....	48
11.5. Caracterização do álcool por espectroscopia no infravermelho.....	50
12. CONCLUSÕES.....	53
13. REFERÊNCIAS.....	54
Anexo A.....	66
Anexo B.....	67



## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Composição química aproximada do mel.

**FIGURA 2.** Principais áreas tecnológicas de aplicação de produtos de mel associados ao álcool.

**FIGURA 3.** Imagens das amostras de resíduo de mel silvestre em diferentes estágios de fermentação no momento da coleta.

**FIGURA 4.** Imagens das amostras de resíduo de mel silvestre em diferentes estágios de fermentação.

**FIGURA 5.** Desenho representativo da análise de °Brix.

**FIGURA 6.** Ilustração dos métodos utilizados para fermentação em processo semi anaeróbico em estufa e câmara de anaerobiose.

**FIGURA 7.** °GL (%) com 72 horas de fermentação e 10% V/V de *E. coli*.

**FIGURA 8.** °GL (%) da amostra de álcool (D), obtida em fermentação com 10% do V/V de *E. coli* nos tempos de 0 a 120 horas.

**FIGURA 9.** Espectros FTIR das amostras de álcool (A, B, C e D) e mel comercial, comparado ao espectro de etanol PA.



## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Microrganismos que podem ser encontrados em méis de abelhas.

**TABELA 2.** Bandas de absorção em regiões de interesse para os compostos químicos-infravermelho.

**TABELA 3.** Pasteurização das amostras do resíduo de mel.

**TABELA 4.** Características físico-químicas dos resíduos de méis silvestres oxidados.

**TABELA 5.** Teor de álcool das amostras de mel (A, B, C e D), obtidas em fermentação de 10% V/V de *E. coli* no tempo de 72 horas de acordo com o método aplicado ((1) erlenmeyer em estufa, (2) kitassatos interligados em estufa e (3) erlenmeyer em câmara de anaerobiose).

## LISTA DE EQUAÇÕES

**EQUAÇÃO 1.** Reação envolvida no processo de fermentação do etanol.

**EQUAÇÃO 2.** Padronização dos Fehling.

**EQUAÇÃO 3.** Determinação de açucares redutores (AR).

## LISTA DE REAÇÕES E MECANISMOS DE REAÇÕES

**REAÇÃO 1.** Reação estequiométrica da fermentação etanólica.

**REAÇÃO 2.** Esquema resumido da glicólise.

**REAÇÃO 3.** Destino do piruvato na fermentação alcóolica na levedura.

**REAÇÃO 4.** Via metabólica de fermentação do etanol em *S. cerevisiae*.

**REAÇÃO 5.** Manutenção energética das células, piruvato reduzido a etanol com a liberação de dióxido de carbono.

## RESUMO

**LEITE, Kamila Rodrigues. Produção de álcool a partir de resíduo de mel silvestre por fermentação com *Escherichia coli*. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava PR. 2017.**

Neste estudo foi investigado a produção de álcool por fermentação de resíduos de mel silvestre com *Escherichia coli*. A necessidade e o interesse de novas fontes de energia renovável e o aproveitamento de resíduos como o do mel, que na região Centro-Sul do estado do Paraná é expressiva, faz-se necessário a exploração do assunto. As amostras de mel silvestre oxidado, foram coletadas de um único fornecedor, da cidade de Prudentópolis – PR (25° 12' 47" S, 50° 58' 40" O) da empresa Multi Flora. Para a fermentação, o primeiro método aplicado foi o sistema semi anaeróbico com erlenmeyer, avaliando a produção de álcool ao longo do tempo de 0 a 72 horas de fermentação com 10% V/V de *E. coli*. Após, o mel oxidado D foi avaliado na fermentação de 0 a 120 horas. Os álcoois obtidos foram analisados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Todas as amostras residuais obtiveram resultado positivo para produção de álcool, em que se destaca a amostra residual (D). Ao comparar os tempos de fermentação empregados para este método, observou-se que houve um declínio na produção após 72 horas de fermentação, até às 120 horas, relacionado com a presença de metabólitos secundários do processo fermentativo da amostra e também a temperatura do processo. As comparações dos resultados dos métodos de fermentação foram importantes para observar que as amostras de álcool resultantes variaram de acordo com o método empregado, sendo o método mais eficiente o de sistema em câmara de anaerobiose com erlenmeyer. Pela caracterização do álcool por FTIR identificou-se os compostos orgânicos e evidenciou espectros similares ao etanol PA, reafirmando que o método em sistema de câmara de anaerobiose com erlenmeyer o mais eficiente em termos de qualidade.

**Palavras-chave: etanol; resíduo; mel; fermentação; *Escherichia coli*.**

## ABSTRACT

**LEITE, Kamila Rodrigues. Production of alcohol from wild honey residue by fermentation with *Escherichia coli*.** 2017 Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava PR. 2017.

In this study, the production of alcohol by fermentation of wild honey residues with *Escherichia coli* was investigated. The need and interest of new sources of renewable energy and the use of waste such as honey, which is significant in the Center-South of the state of Paraná, makes it necessary to explore the subject. The samples of rusty wild honey were collected from a single supplier from the city of Prudentópolis - PR (25° 12 '47 "S, 50° 58' 40" W) of Multi Flora. For the fermentation, the first method applied was the semi-anaerobic with Erlenmeyer system, evaluating the alcohol production over time from 0 to 72 hours of fermentation with 10% V / V of *E. coli*. After the oxidized honey D was evaluated in the fermentation from 0 to 120 hours. The obtained alcohols were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). All the residual samples obtained a positive result for alcohol production, in which the residual sample (D) stands out. When comparing the fermentation times employed for this method, it was observed that there was a decline in production after 72 hours of fermentation, up to 120 hours, related to the presence of secondary metabolites of the fermentation process of the sample and also the temperature of the process. The comparisons of the results of the fermentation methods were important to observe that the resulting alcohol samples varied according to the method used, being the most efficient method the system in an anaerobic chamber with erlenmeyer. Through the characterization of alcohol by FTIR, the organic compounds were identified and ethanol PA spectra were detected, reaffirming the efficiency of the method in an anaerobic chamber system with erlenmeyer in terms of quality.

**Key Words:** ethanol; residue; honey; fermentation; *Escherichia coli*.

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é um alimento produzido pelas abelhas *Apis mellifera L.*, e pode ser obtido a partir do néctar das flores, das secreções de plantas ou de excreções de insetos. Essas substâncias são coletadas pelas abelhas, e ao serem armazenadas para o amadurecimento, tornam-se favos da colmeia.

Os produtos desenvolvidos, a partir do mel, nas propriedades rurais, ainda que em pequeno volume, agregam maior valor ao mel, complementando a renda dos apicultores com a produção de cera de abelha, própolis, pólen, geleia real, apitoxina, hidromel, manteiga com mel, iogurte com mel, licores, doces, sorvetes, cosméticos, entre outros.

A apicultura no Brasil tem grande potencial, devido à flora diversificada, variabilidade climática e a sua extensão territorial, possibilitando o maior aproveitamento na produção que pode ocorrer o ano todo, o que não é possível em relação aos outros países que geralmente coletam mel uma vez ao ano.

A maior parte da produção mundial do mel é vendido para ser consumido como mel de mesa ou utilizado na indústria alimentícia. Produtos fermentados à base de mel são largamente conhecidos e consumidos na Europa.

O mel é o produto mais conhecido e comercializado no mundo. Em algumas regiões sendo mais utilizado como medicamento do que como alimento. Sua utilização na cicatrização e em feridas é amplamente relatada na literatura médica do Egito, Grécia e da Índia, devido à ação redutora em infecções, feridas, edemas, dor e odor. Além das propriedades medicinais o mel é um ótimo alimento natural para crianças e pessoas debilitadas, por conter açúcares redutores que são facilmente digestíveis. A utilização de mel como um produto fitoterápico, em relação a sua importância, é uma prática tradicional.

A exploração de novos produtos a partir do mel está iniciando no Brasil, esse cenário ainda instável, deve-se a baixa tecnologia para tal aplicação, e também a falta de tradição nos mercados ocasionada por fatores culturais. Para a estabilidade desses produtos no mercado, faz-se necessário o estímulo de novas instalações, e projetos que visem não só a exploração do mel, mas também sua incorporação para a obtenção dos outros produtos no processo produtivo. Outro fator a ser considerado é o meio de obtenção do mel, no qual os utensílios e equipamentos empregados na extração devem ser aperfeiçoados para o beneficiamento, aproveitando seu resíduo de forma sustentável.

A ação de microrganismos para a obtenção de produtos fermentados ocorre há milhares de anos, como em bebidas alcoólicas, queijo, pão, iogurte, molho de soja, entre outros. O consumo do álcool por diferentes civilizações como o hidromel e a cerveja, inicia-se com a

revolução neolítica, sendo essas as bebidas mais consumidas nesse período datado em 2200 a.C.

Na região Centro-Sul do Paraná a atividade apícola na cidade de Prudentópolis tem expressiva produção, devido aos produtos extraídos da colmeia e de derivados do mel. Apesar da dinâmica atividade apícola nesta região, torna-se urgente a valorização da complexidade do mel, sendo assim, importante encontrar alternativas que beneficiem o manejo e armazenamento do produto. Essa questão acaba se tornando um problema regional e não existem dados que apontam a quantidade de resíduo do mel gerado na região.

No que diz respeito às características do mel, ainda é possível observar a ocorrência de diversos microrganismos, onde estes estão envolvidos em um dos principais critérios de qualidade do produto, acompanhado às características sensoriais, químicas e físicas. Estes critérios de qualidade são especificados em regulamentos internacionais, que estão coligidos no Codex Alimentarius.

Os microrganismos como bactérias, leveduras, fungos, protozoários e vírus, são seres unicelulares presentes no organismo humano e dos animais, onde desde o nascimento, convivem com a microbiota da biosfera composta por inumeráveis microrganismos. Esses microrganismos podem ser inclusos em categorias: patogênicas e deteriorantes, sendo este último, o mais importante para os alimentos. Portanto, o controle é indispensável para a avaliação da qualidade do produto, pois a colonização de bactérias pode indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes.

De acordo com o SEBRAE, é produzido em território brasileiro em média quarenta mil toneladas de mel por ano, onde a maior parte é destinada para a exportação, principalmente para os EUA e Europa, com um preço médio de US\$ 2,88/kg, mas em alguns estados o mel é vendido abaixo desse valor médio de produção, como acontece em Santa Catarina, seu preço médio de venda foi de US\$ 2,57/kg em julho de 2010. E também parte do mel produzido não se enquadra nos padrões de qualidade que são exigidos pelos padrões de qualidade da legislação brasileira. Sendo assim, para agregar valor ao produto final é importante a elaboração de coprodutos a partir do mel, visando o aproveitamento de parte desta produção. Os coprodutos que se destacam são a aguardente de mel e/ou hidromel.

Devido ao desenvolvimento industrial e conseqüentemente o uso abusivo de hidrocarbonetos, ocasionou a diminuição das reservas de petróleo, aumento do preço de seus derivados e contaminação ambiental. A ampliação da oferta de energia, principalmente renováveis e promover o desenvolvimento com baixos índices de impacto ambiental preservando as fontes energéticas, é um grande desafio para a comunidade científica da

atualidade. Desde o século passado a energia alternativa é investigada, mas hoje é sinônimo de energia renovável.

Estudos que visam à otimização de bioprocessos fermentativos do mel são considerados desafiadores, deve-se adotar soluções tecnológicas para maximizar variáveis importantes para o processo, minimizando custos operacionais e evitando a desconformidade dos produtos, mantendo a apicultura um ramo industrial viável.

Embora o agente de fermentação alcoólica seja as leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, existem estudos para selecionar outros microrganismos capazes de produção de etanol. Isto poderia ser alcançado com a utilização de matérias primas regionais, como substratos no processo biotecnológico, que pode ser uma alternativa atrativa e promissora. Nem sempre têm sido consideradas as condições de cultivo e os processos fermentativos para determinar os parâmetros que um determinado microrganismo necessita para uma ótima síntese de produtos fermentativos. Muitos países têm realizado estudos de fermentação, que incluem o uso de bactérias em vez da tradicional levedura, para reduzir o tempo de fermentação alcoólica.

Um microrganismo em potencial é a bactéria *Escherichia coli*, podendo ser usada em processos industriais por ser amplamente estudada, tanto no ponto de vista fisiológico como genético, pois é capaz de fermentar grande quantidade de açúcares da biomassa lignocelulósica, entretanto produz uma mistura de produtos de fermentação de pequeno valor agregado. Vários estudos mostraram a capacidade fermentativa da *E. coli* recombinante, como a *E. coli* KO11, sendo esta capaz de fermentar uma ampla variedade de açúcares (lactose, glicose, frutose, galactose, manose, xilose) convertendo-os para etanol, com rendimentos próximos aos teóricos. Além disso, a *E. coli* é de fácil manutenção e operação, sendo uma vantagem sobre as demais bactérias.

Os processos industriais para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, milho e beterraba já estão vastamente estabelecidos. Estudos realizados recentemente fazem comparações usando leveduras e bactérias para fermentar hidrolisados, mostrando que a *E. coli* KO11 foi superior a outros microrganismos, em relação a produtividade e rendimento de etanol, e também por ser resistente a produtos inibidores produzidos durante a hidrólise. No entanto, melhorias devem ser feitas, tanto na parte técnica como no desempenho do microrganismo, são necessários para reduzir os custos do processo.

Portanto, a bactéria *Escherichia coli* pode ser um microrganismo estudado enquanto modelo geral para os mecanismos biológicos, tendo um papel importante na microbiologia industrial e bioengenharia, promissora para produção de etanol.



## 2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Produzir álcool por fermentação via *Escherichia coli* de quatro amostras de resíduo de mel silvestre em diferentes períodos de armazenamento.

Objetivos específicos:

1. Determinar a rota semi anaeróbica e aeróbica para a fermentação das amostras de resíduo de mel silvestre com *Escherichia coli*.
2. Quantificar o álcool produzido pelo processo de fermentação via *Escherichia coli* e caracterizar o álcool obtido pela fermentação dos resíduos de mel silvestre utilizando espectroscopia na região do infravermelho.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Mel

De acordo com o Decreto-Lei 214/2003 de 18 de setembro, entende-se que mel é uma

“substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes das partes vivas ou de excreções de insetos fitófagos, que as abelhas recolhem, transformam por combinação de substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia” (BRASIL, 2003).

O néctar é a principal matéria prima utilizadas pelas abelhas na obtenção do mel, no qual sua origem advém dos fluidos circulantes em plantas vasculares. Estes fluidos são responsáveis pela distribuição dos nutrientes nos tecidos vegetais, oriundos dos dois principais sistemas das plantas: xilema (sistema vascular que conduz água e minerais) e floema (sistema vascular que conduz matéria orgânica) (DE MARIA; MOREIRA, 2003).

A atividade da criação racional de abelhas consegue obter resultados positivos a nível econômico, ecológico e social. Essa atividade vem despertando o interesse de muitos criadores e instituições do Brasil (RODRIGUES et al., 2005). No qual a produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) encontra-se em crescimento devido ao incentivo do governo, o que permite a geração de trabalho e renda para os pequenos agricultores (MDS et al., 2007).

O mel pode ser classificado como floral quando obtido do néctar das flores e denominado mel de melato quando oriundo de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores vivos de plantas (BRASIL, 2000). Há vários aspectos que diferem o mel de melato e o mel de floral. O mel de melato possui menor teor de glicose, e também apresenta menor teor de frutose, oligossacarídeos, de cinzas, < pH e nitrogênio (CAMPOS et al., 2003).

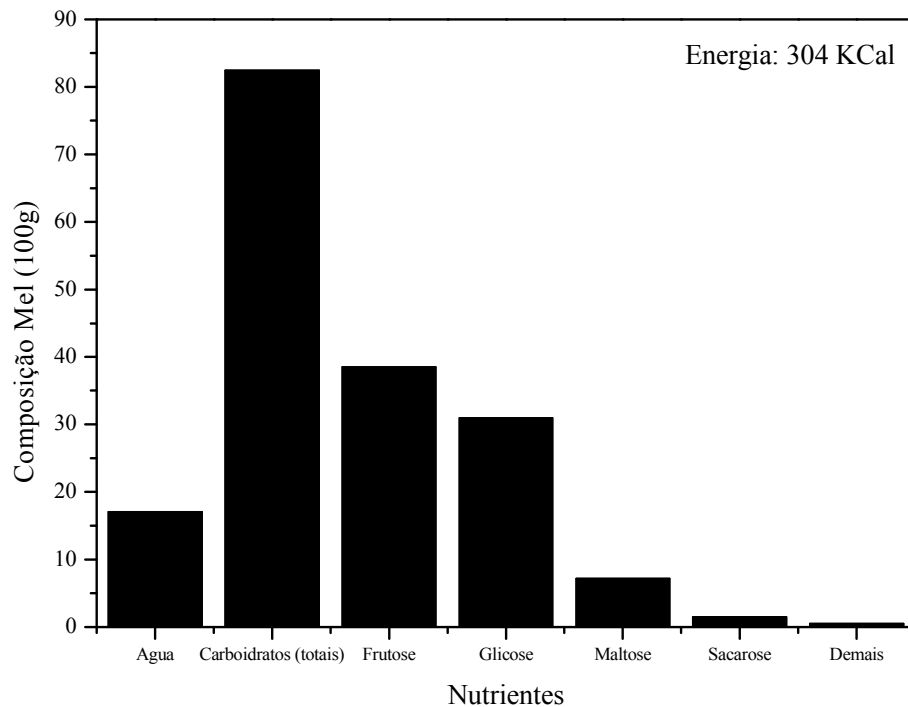
De acordo com o modo de produção ou de apresentação o mel pode ser classificado em mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel centrifugado, mel prensado ou mel filtrado.

#### 4. COMPOSIÇÃO

A composição do mel depende principalmente da fonte floral, ou seja, da flor que o néctar é extraído, do clima, das condições ambientais e sazonais, bem como do manuseio e do processamento (ANKLAM, 1998; AL-MAMARY et al., 2002; AZEREDO et al., 2003; ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; BALTRUŠAITYT et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007).

O mel é constituído por um elevado número de substâncias (cerca de 181 compostos) (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006), sendo uma mistura complexa de carboidratos, dos quais os açúcares redutores, frutose, glicose, maltose e sacarose, além da molécula de água ligada a estes açúcares por ligações de hidrogênio, os quais são os principais constituintes. Outras substâncias estão também presentes em pequenas quantidades, tais como: sais minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas e outros fitoquímicos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). Alguns destes compostos são conhecidos por terem propriedades antioxidantes (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), a solução de mel é concentrada por açúcares em grande maioria glicose e frutose. É uma mistura complexa, pois contém ainda hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grão de pólen podendo conter cera de abelha proveniente do processo de extração. Segundo VENTURINI et al. (2007) alguns desses componentes estão na apresentados na Figura 1.



**FIGURA 1.** Composição química aproximada do mel.

As propriedades sensoriais, físicas e químicas do mel são avaliadas por parâmetros estabelecidos no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de setembro e na norma do Codex Alimentarius que incluem pH, teor de água, teor de açúcares redutores, teor de sacarose, teor de matérias insolúveis na água, teor de minerais, condutividade elétrica, teor de cinzas, acidez, teor de hidroximetilfurfural (HMF) e índice diastásico.

Os constituintes maioritários do mel são os hidratos de carbono, correspondem cerca de 95 a 99% da matéria seca (OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007), primordialmente a glicose (30,3%), a frutose (38,4%) e a sacarose (1,3%), e cerca de 12% são outros hidratos de carbono constituintes (IURLINA; FRITZ et al., 2005), e incluem dissacarídeos como maltose e isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos (ANKLAM, 1998).

Lazaridou et al. (2004), relatam que pela técnica de Cromatografia Gasosa (CG), puderam estudar a composição de açúcares de méis gregos selecionados, determinaram que a glicose (13,5-36,3%) e a frutose (22,1-41,3%), sendo estes os açúcares sempre mais abundantes. A menor porcentagem de glicose e frutose correspondem ao mel de melado. Os dissacarídeos o que se destaca é a maltose, os valores variaram entre 1,9% e 6,7%. Para a maioria das amostras os níveis encontrados de sacarose foram relativamente baixos, o que

indica que a seleção dos méis ocorreu em estágio avançado de maturação. Os autores também identificaram vários trissacarídeos como rafinose, erlose, melezitose, panose, isomaltotriose e maltotriose, constatando que a melezitose esteve presente em quantidades relativamente altas (9,1-14,4%) na maioria das amostras de mel de melato.

O elevado nível de sacarose presente no mel pode ser resultado de uma recolha prematura, pois a sacarose sofre ação da enzima invertase secretada pelas abelhas, já que a sacarose não foi totalmente dissociada em glucose e frutose (KÜÇÜK et al., 2007). Podendo ainda indicar adulteração do mel (SODRÉ et al., 2007). Dentro deste parâmetro o valor máximo permitido no mel é de 5% de sacarose, podendo existir exceções para outros tipos de mel.

A água é o segundo constituinte mais importante do mel (IURLINA; FRITZ, 2005). A atividade da água necessária para o desenvolvimento de microrganismos é inferior a 0,98 e também depende da classe de microrganismo, sendo em torno de 0,70 para fungos, 0,80 para leveduras e 0,90 para bactérias. No mel a atividade da água varia de 0,5 a 0,65. A fermentação do mel pode ser causada por leveduras osmofílicas, estas conseguem se desenvolver em meios contendo alta concentração de açúcar e baixa atividade de água, em torno de 0,6 de humidade (GLEITER; HORN; ISENGARD, 2006).

A presença de água no mel pode variar devido a fatores como, época da coleta, grau de maturação do mel na colmeia e de fatores climáticos (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007). Portanto a água é um parâmetro que influencia nas propriedades físicas do mel, como a viscosidade (OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007).

De acordo com Lazaridou et al. (2004), a maioria dos méis são soluções supersaturadas de glicose, que têm uma tendência a cristalizar-se espontaneamente à temperatura ambiente, sob a forma de glicose monohidratada. Esta granulação é um processo indesejável do mel no estado líquido, pois afeta suas propriedades e textura tornando-o menos atraente para o consumidor. Em muitos casos a cristalização do mel resulta no aumento do teor de água na fase líquida o que permite que microrganismos se multipliquem causando a fermentação do produto.

Gleiter, Horn e Isengard (2006), estudaram os tipos de mel e os estados físicos que se encontram, líquido ou cristalizado, avaliando a influência da atividade da água. Os resultados desses autores mostraram que a atividade da água no mel cristalizado é mais elevada do que do mel líquido. Também detectaram diferenças entre méis de melato e os méis de florata, onde no estado líquido o mel de melato apresenta maior teor de água do que no mel de florata, mas não houve diferença significativa de água entre os diferentes tipos de mel quando estão

no estado cristalizado. A atividade da água depende principalmente do teor de glicose afirmam os autores, pois a molécula de água presente no mel está ligada a açúcares por meio de ligações de hidrogênio.

O conteúdo excessivo de água presente no mel interfere dificultando na preservação e armazenamento e, de fato, é um fator contribuinte para sua fermentação e granulação durante o armazenamento (KÜÇÜK et al., 2007).

Os ácidos orgânicos são responsáveis pela acidez do mel, com o pH podendo variar entre 3,5 e 5,5, devido à presença desses ácidos que contribuem para o sabor e estabilidade frente a deterioração microbiana (BOGDANOV et al., 1997; ODDO et al., 2004; AROUCHA et al., 2008).

Encontram-se no mel os seguintes ácidos orgânicos: ácido acético; ácido butírico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido glucônico, ácido láctico entre outros. A acidez do mel deve-se a esta composição de ácidos que depende da fonte de néctar. Entre os ácidos encontrados no mel o principal é o ácido glucônico que é formado pela ação da enzima de glicose-oxidase de bactérias durante a maturação do mel (ARAÚJO; SILVA; SOUSA, 2006).

A presença de ácidos orgânicos no mel influencia na velocidade de fermentação e fazem com que o mesmo pare de fermentar, esse fenômeno ocorre devido à formação de ácido succínico, o que depende da cepa da levedura utilizada e presença de compostos de nitrogênio (SROKA; TUSZYNSK, 2007).

Os méis florais apresentam valores de acidez inferiores devido a influência da época do ano em que se é feita a colheita e o tipo de floral (KÜÇÜCA et al., 2007). Finola et al. (2007) constataram a existência de uma relação inversa entre a acidez livre e o teor de cinzas do mel. Esta relação é explicada pelos autores, que considera o teor elevado de minerais correspondente à presença de uma fração maior de ácidos salinizados.

O valor médio do pH do mel é um parâmetro que está relacionado com a acidez livre devido a ocorrência da ação de tamponamento dos ácidos e minerais que estão presentes no meio (IURLINA; FRITZ, 2005)

A quantidade dos minerais presentes é pequena, variando entre 0,04% em méis claros e 0,2% em alguns méis escuros (ANKLAM, 1998). Os minerais mais encontrados no mel são: o cálcio, o magnésio, o sódio, o cobre, o ferro, o manganês, o enxofre, o chumbo, o zinco, o cromo, o cádmio, o fósforo e o níquel, sendo que o potássio é mineral mais abundante neste alimento (BOGDANOV et al., 1997; OLAITAN et al., 2007).

Nos méis de abelha geralmente são encontrados diferentes elementos químicos e minerais, entretanto no mel floral os valores desses elementos são acima de 0,6% (BRASIL et

al., 2000), e são considerados indicativo de contaminação (SODRÉ et al., 2007).

A determinação das cinzas é realizada pelos sólidos insolúveis em água e minerais, no qual esses parâmetros são indicadores de pureza do mel podendo detectar irregularidades no processamento deste, como a contaminação causada pela falta de decantação, ou pela filtração no final do processo da extração, onde por esses processos ocorre a retirada da impureza do mel (SILVA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2004).

Os sólidos insolúveis presente no mel não podem ultrapassar a quantidade de 0,1 g/100 g, exceto no mel prensado que pode tolerar 0,5 g/100 g (BRASIL, 2000).

Normalmente o teor de cinzas no mel é baixo, o qual depende do material recolhido, néctar e melada (DE RODRÍGUEZ et al., 2004). Os méis de cor clara têm um teor de cinzas menor do que os méis de cor escura (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007).

O mel também é composto por enzimas (KOMATSU et al., 2002; SOUZA et al., 2008). As principais enzimas presentes no mel são a invertase, a amilase e a glucose-oxidase, as quais possuem funções especiais na produção e proteção do mel pelas abelhas. A hidrólise da sacarose em glicose e frutose ocorre pela ação da enzima invertase, no momento que a abelha coleta o alimento; a diástase também tem função de hidrolisar o amido presente; a formação do ácido glucônico e peróxido de hidrogênio ocorre pela reação da glucose-oxidase com a glicose o, que implica na atividade antimicrobiana no mel e enriquece a substância diversificando assim o sabor característico (WHITE JUNIOR, 1957; CRANE, 1983; MOLAN, 1992).

De acordo com Camargo et al. (2003), a enzima invertase irá permanecer no mel conservando sua atividade, a menos que seja inativado pelo aquecimento. A inversão de sacarose em glicose e frutose propicia uma solução mais concentrada de açúcares, sendo assim, aumentada a resistência do mel à deterioração por fermentação.

A concentração de azoto do mel varia bastante e pode ser reduzido, sendo o valor médio de 0,04%. Os alcaloides, derivados da clorofila, aminoácidos, amins, prolina, arginina, triptofano e cisteina são compostos nitrogenados, onde a prolina é o composto mais predominante (ANKLAM, 1998).

Dentre os aminoácidos encontrados no mel a prolina é o mais abundante no pólen de muitas espécies de vegetais, portanto é encontrado em maior quantidade no mel (FERREIRA et al., 1990). A análise de avaliação do perfil dos aminoácidos se adequa a detecção da origem botânica e composição proteica do mel (ANKLAM, 1998).

De acordo com Aroucha et al. (2008) o teor de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o índice diastásico são parâmetros que indicam a pureza do mel. Na ausência destes

procedimentos refletem a adulterações, até mesmo de temperatura acima de 60°C durante o processo de beneficiamento, temperaturas elevadas em tempo superior a 6 meses, em condições inadequadas de armazenamento e adição de açúcar (BRASIL, 2000). Os limites estabelecidos para estes dois parâmetros são um mínimo de 8, para o índice diastásico e o máximo de 40 mg/kg, para o HMF.

A presença de (HMF) no mel, ocorre pela desidratação das hexoses catalisada por ácidos, e acontece em vários alimentos (SILVA et al., 2008). Esse composto furânico é formado por condições favoráveis em meio ácido com presença de açúcares simples e água (NOZAL et al., 2001).

Os compostos voláteis são provenientes do néctar das flores, já identificados cerca de mais de 300, como ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres (CASTRO-VÁZQUEZ et al., 2009). Esses são responsáveis pelo sabor característico do mel (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007). Esses compostos fornecem informações botânicas, origem e sua produção deu-se pelo néctar de flores ou de exsudatos das plantas ou insetos (ESCRICHE et al., 2009).

Os compostos fenólicos são constituintes secundários que estão em enorme variedade como os ácidos fenólicos e flavonoides, grupos como das flavononas e flavonas se destacam por pertencerem aos principais flavonoides. Os flavonoides que se destacam no mel são quercetina, tricetina, hesperatina, luolina, miricetina, crisina e outros (ANKLAM, 1998).

A cor do mel é uma característica definida pela legislação brasileira podendo ser quase incolor a pardo-escura, de acordo com sua classificação de origem (BRASIL, 2000).

Segundo Crane (1983), a cor do mel está relacionada a fatores climáticos, temperatura que o mel é submetido durante o amadurecimento na colmeia, a origem floral, bem como sua composição. Estes são parâmetros indicadores de qualidade, já que estão associados ao escurecimento do produto ao armazenamento, às condições de temperatura elevada e também à contaminação por metais. O escurecimento do mel sensível à temperatura de estocagem pode estar ligado à produção de (HMF).

O espectro polínico é uma análise feita com o pólen, objetivando de identificar a origem do mel, ou seja, a origem da botânica, em alguns casos sua origem geográfica, pois este nunca tem apenas uma única fonte floral, pois o pólen pode reagir com o néctar durante a coleta das abelhas, armazenam-se nos favos, e também podem ser inseridos no néctar por meio do corpo das abelhas (BARTH et al., 2005).



#### 4.1. Propriedades do Mel

O mel vem sendo utilizado de diversas maneiras pelo homem, além de alimento também como medicamento por apresentar propriedades anti-septicas e conversacionais a frutas e grãos (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991).

O mel é uma substância de origem animal de alto valor nutritivo e com propriedades medicinais, antioxidativas e assépticas, estes estão relacionados à grande variedade de compostos fenólicos o que torna o seu uso de alto potencial medicinal (KÜÇÜK et al., 2007).

Um antioxidante é uma substância que se apresenta em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável, estas substâncias previnem ou retardam a oxidação desse substrato. Os radicais livres são produtos gerados pelo metabolismo celular e seu efeito desfavorável causa estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) provocam anomalias nas células e o consumo de antioxidantes limita e previne os efeitos provocados por estes radicais livres. O equilíbrio da produção de radicais livres e de defesas antioxidantes é essencial para a manutenção do funcionamento normal do organismo humano (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002).

Os antioxidantes presentes no mel agem na prevenção nas reações de deterioração dos alimentos, ocasionado pelo processo enzimático nas frutas e vegetais, oxidação lipídica da carne e inibi o crescimento microbiológico, além disso, exercem um importante papel na prevenção ou retardamento de doenças degenerativas (BERTONCELJ et al., 2007; YEPES et al., 2002; CAMPOS et al., 2008).

Atualmente existem diversos estudos que comprovam a ação terapêutica do mel relacionado a propriedades antioxidantes tais como polifenóis e os flavonoides (SERRA, 2007). Estes compostos já foram identificados no mel como ácidos cafeico, cinâmico, cumárico e ferúlico, a quercitina, a cistina e o canferol (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001).

Phillips, Carlsen e Blomhoff (2009), verificaram a presença de antioxidantes avaliando seu conteúdo com adoçantes naturais alternativos ao açúcar refinado, dentre todos os analisados o mel apresentou uma significativa capacidade oxidava intermediária.

As características físico químicas do mel conferem-lhe propriedades únicas, sendo assim, usado como medicamento por milhares de anos no tratamento de infecções gastrintestinais, queimaduras, feridas ulceras e doenças respiratórias (MULU et al., 2004; KÜÇÜK et al., 2007; BASUALDO et al., 2007).

Muitos estudos são desenvolvidos por investigadores sobre a atividade antibacteriana do mel, contra patógenos resistentes a antibióticos, muitos desses envolvidos em algumas doenças (MULU et al., 2004; KUMAR et al., 2005; LUSBY et al., 2005).

As bactérias possuem sensibilidades diferentes ao mel, algumas supersensíveis como *Staphylococcus aureus* (ESTEVINHO et al., 2008), *Staphylococcus epidermidis* (BASUALDO et al., 2007), *Bacillus stearothermophilus* (MUNDO; PADILHA-ZAKOUR; WORO, 2004), enquanto outras moderadamente sensíveis como *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (BASUALDO et al., 2007), *Bacillus cereus* (TAORMINA et al., 2001), *Alcaligenes faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (MUNDO; PADILHA-ZAKOUR; WORO, 2004), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* (KÜÇÜK et al., 2007).

Henriques relata que de início acreditava-se que as propriedades antibacterianas do mel fossem derivadas, devido à presença alta concentração de açúcares em sua solução possuir um pH baixo, entre 3,0 e 5,0, estes fatores inibem o crescimento de várias espécies de microrganismos. Entretanto existem microrganismos resistentes que sobrevivem em ambientes onde há grande stress osmótico e pH bastante baixos, que pareciam não resistentes ao mel como é o caso do *Staphylococcus aureus*. Este autor evidenciou a presença da substância que lhe conferia atividade antimicrobiana, devido a mistura do açúcar artificial com o mel natural, uma mistura proporcional correspondente aos açúcares e ao pH do mel natural. E logo estava presente um componente denominado “inhibine”, mais tarde identificado como peróxido de hidrogênio (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

A principal substância com responsabilidade antimicrobiana no mel é o peróxido de hidrogênio, formado a partir da reação de oxidação da glicose pela enzima glucose oxidase, no processo de amadurecimento do mel (BARHATE et al., 2003).

O nível de peróxido de hidrogênio no mel é determinado pelos níveis de glucose oxidase e catalase. Quando o nível da glucose for grande, o nível de peróxido de hidrogênio será correspondente, e quanto menor o nível de catalase, maior o nível de peróxido de hidrogênio (WESTON, 1957).

Segundo Taormina o peróxido de hidrogênio inibe o crescimento de algumas bactérias patogênicas presente nos alimentos, e constataram ainda, segundo teste nos antioxidantes presentes no mel, que essa atividade antimicrobiana permanece no mel tratado com catalase para a remoção do peróxido de hidrogênio.

A atividade microbiana do mel está relacionada ao tipo de mel produzido pelas abelhas, dependente da floração e da época do ano. Assim o néctar recolhido das flores pelas abelhas, contribuem nas diferentes atividades antimicrobianas do mel (BASUALDO et al., 2007).

#### 4.2. Microbiota Presente no Mel

A pesquisa de bactérias, fungos e leveduras em mel é de grande importância, já que se trata de um alimento, pois muitas pesquisas científicas indicam para o conhecimento dos microrganismos existentes em méis, como os descritos na Tabela 1:

Os microrganismos presentes no mel estão relacionados à segurança deste alimento; os mais importantes são primeiramente leveduras, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos. Estes estão envolvidos em atividades de deterioração, produção enzimática, toxinas, produção de vitamina e aminoácidos que estão relacionados a fatores de crescimento e inibição de microrganismos competitivos, além da conversão metabólica do alimento (SILVA et al., 2008).

De acordo com Snowdon e Cliver (1996), os microrganismos encontrados no mel são espécies divididas em microrganismos que são encontrados naturalmente no mel; microrganismos que indicam qualidade sanitária e comercial; microrganismos que em determinadas condições podem causar doenças ou intoxicação.

As fontes de contaminação do mel são classificadas em primárias e secundárias. A contaminação primária tem como fonte microbiana o pólen, o trato digestivo das abelhas, o pó, o ar e as flores (OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007). A contaminação secundária do mel advém do homem, as embalagens e equipamentos, o vento, a sujeira, os insetos, os animais e a água. A ocorrência de microrganismos na forma vegetativa são indicadores de contaminação recente do mel por uma fonte secundária, já que na forma vegetativa não evidenciam capacidade de sobreviver (SNOWDON; CLIVER, 1996).

**TABELA 1.** Microrganismos que podem ser encontrados em méis de abelhas.

<b>Bactérias</b>	<i>Alcaligenes, Bacillus, Bacteridium, Bacterium, Brevibacterium, Clostridium, Enterobacter, Flavobacterium, Klebsiella, Neisseria, Proteus, Pseudomonas e Xanthomonas.</i>
<b>Fungos (Leveduras)</b>	<i>Ascospaera, Debaryomyces, Hansenula, Lipomyces, Nematospora, Oosporodium, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, Trichosporan, Torula, Torulopsis e Zygosaccharomyces.</i>
<b>Fungos (Bolors)</b>	<i>Aspergillus, Atichia, Bettsia alvei, Cephalosporium, Chaetomium, Coniothecium, Hormiscium, Penicillium, Peronsporaceae, Peryonella, Triposporium e Ustilaginaceae.</i>

Fonte: ESTRADA et al. (2005); SNOWDON, CLIVER (1996).

O controle da fonte de contaminação secundária são fáceis de controlar, pois podem

ser controladas com uma correta higienização e com boas práticas de fabricação.

Os bolores normalmente encontrados no mel pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*; estes podem sobreviver, mas não se reproduzir no mel, devido a isso, há contagens elevadas de estirpes de *Bettysa alvei*, *Acosphaera apis* e *Acosphaera major*, podendo indicar contaminação recente pelo ambiente de recolha da abelha, colmeia ou equipamento de processamento (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007).

As principais leveduras encontradas no mel são pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, no entanto, já foram detectadas do gênero *Debaromyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Zygasacchamycetes*, entre outros. Os méis têm elevada contagem de leveduras devido à ocorrência de fermentações, onde estes não podem ser comercializados, pois as leveduras produzem ácido, gás e outros, por meio da utilização dos açúcares presente, o que torna o mel impróprio para o consumo (SNOWDON; CLIVER, 1996).

Algumas espécies de fungos presente nos alimentos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são indesejáveis, pois são capazes de produzir enzimas deteriorantes, como a produção de micotoxinas, que são produtos oriundos do metabolismo secundário considerados tóxicos, e representam um risco de contaminação ambiental acarretando sérios prejuízos para a saúde humana. Atualmente em muitos alimentos estão presentes toxinas liberadas por essas espécies de fungos, que implicam como fonte de exposição para o homem (CORRÊA et al., 1997; BANDO et al., 2007).

Os microrganismos associados ao mel incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, entre outros. Os esporos de bactérias mais comuns no mel são dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. As espécies mais frequentes do gênero *Bacillus* são *B. cereus*, *B. megaterium*, e *B. coagulans* (FINOLA et al., 2007; LÓPEZ et al., 2009).

### 4.3. Escherichia Coli

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa com formato de bacilo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tem como habitat natural o intestino dos animais e dos homens (TRABULSI; ALTHERTUM, 2005), onde exerce efeito benéfico ao organismo cessando a multiplicação de microrganismos prejudiciais e sintetiza uma considerável quantidade de vitaminas. Entretanto, há um grupo de cepas capaz de provocar doenças coletivas em humanos, chamada de *E. coli* enteropatogênicas (EEC) (SILVA et al., 2004).

Nas últimas décadas os avanços nas áreas de microbiologia e biologia molecular trouxeram, grandes melhorias nos bioprocessos, em especial nas indústrias de biotecnologia,

acarretando um aumento de produtividade e de qualidade dos produtos. Devido este crescente avanço o número de produtos geneticamente modificados, estão sendo lançados e comercializados em áreas farmacêutica, alimentícia e de energia (VOJINOVIC et al., 2006). Relacionada a esses avanços, a *E. coli* é um dos microrganismos mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas, por sua ampla caracterização metabólica e genética, e por métodos precisos e rápidos para a modificação de seu genoma (DEMAIN; VAISHNA, 2009).

ZHANG et al., (2007) e YOMANO et al., (1998), empregaram a *Escherichia coli*, na sua evolução metabólica, e realizaram a produção de diversos biocombustíveis, bem como etanol, que foram bases, por meio da modificação melhorar a produção de etanol via *E. coli*.

Para reduzir o custo do substrato, linhagens recombinantes de bactérias que utilizam fontes de carbono de baixos custos e correspondentes estratégias de cultivo vêm sendo desenvolvidas (LEE, 1996).

Atualmente, técnicas de bioprospecção foram utilizadas para o isolamento de linhagens microbianas capazes de converter glicerina a etanol ou ácido lático (SANTOS; SOUZA, 2014). A obtenção de linhagens microbianas eficientes para o metabolismo da glicerina bruta é um desafio para produção de químicos que também sejam tolerantes a compostos inibitórios, como sais e solventes orgânicos, presentes nessa glicerina. Esse desafio pode ser superado pela exploração da biodiversidade microbiana de ambientes diferentes, já que linhagens dentro de uma mesma espécie respondem diferentemente a compostos inibitórios e/ou a diferentes fontes de carbono (ALMEIDA et al., 2011).

Visando a conversão de glicerol em etanol, COFRÉ, et al (2012) produziram um meio de cultura otimizado para *Escherichia coli*, obtendo uma produção específica de etanol de 212g/kg h por massa de célula e taxa de produção de 59 g/kg de glicerol.

Dharmadi et al. (2006) apresentaram a otimização da fermentação da glicerina, que em condições de pH ácido é necessário a disponibilidade de gás carbono, para o crescimento celular ser maior já que a *Escherichia coli* pode fermentar anaerobicamente o glicerol no prazo de 84 horas de crescimento ativo, onde este foi quase completamente consumido, alcançando uma concentração máxima nas células de 486,2 mg.L<sup>-1</sup>. O etanol representou cerca de 80% (base molar) de produtos. O CO<sub>2</sub> é necessário para que o processo de fermentação do glicerol se processe.

As bactérias apresentam várias vias metabólicas para a síntese e decomposição de polihidroxicanoatos (PHAs) (CHOI; LEE, 1999). Estas estão ligadas ao estado metabólico da célula e ao fluxo de carbono por meio do metabolismo intermediário (BYROM, 1987).

Bactérias como *E. coli* não tem a capacidade de sintetizar ou degradar PHA, todavia

este microrganismo cresce rapidamente a uma temperatura maior, pois ocorre facilmente a dissolução da membrana plasmática. O rápido crescimento permite um tempo de ciclo menor para o processo de produção, enquanto a temperatura de crescimento mais elevada fornece uma economia de custos associada ao resfriamento do bioreator. A lise mais fácil das células proporciona economia de custos durante a purificação dos grânulos de PHA. A *E. coli* recombinante é capaz de acumular grandes quantidades de polímero, representando mais de 80% da massa celular seca (FIDLER, S.; DENNIS, 1992; LEE, 1997).

#### **4.4. Fermentação**

A fermentação é todo processo ocasionado por microrganismos vivos, sejam eles leveduras, fungos ou bactérias, que transformam o substrato em produtos variados, por decomposição, onde os resultados desses produtos dependem da composição do substrato e dos microrganismos envolvidos no processo (JUSTINO; MUTTON; MUTTON, 2005).

A fermentação do mel se dá ao alto teor de umidade, temperatura de armazenamento alta (maior que 26°C) e a presença de leveduras indesejáveis. O processo fermentativo promove a transformação dos açúcares presentes no mel em álcool e gás carbônico. O álcool na presença de oxigênio é convertido em ácido acético, deixando o meio propício para o desenvolvimento e atuação de microrganismos que aceleram o processo de fermentação deteriorando assim a qualidade do mel (VENTURINI et al., 2007).

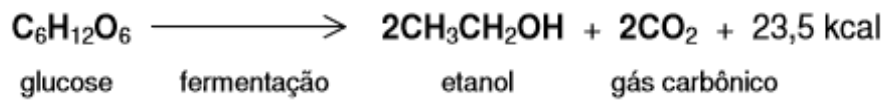
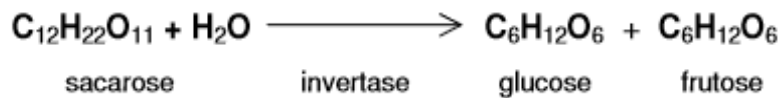
A produção de etanol inclui dois tipos de fermentação: fermentação direta e indireta, o primeiro se utiliza a fermentação direta dos açúcares existentes nas matérias primas, como a cana, melaço, caldo de sorgo, já o segundo processo ocorre pela fermentação indireta das matérias primas, que tem características amiláceas ou celulósicas como grão de cereais, mandioca, batata-doce e bagaço de cana (DERRINGER, 1980; SANTANA, 2007; CARDONA, SANCHEZ, 2007).

Cerca de 80% de todo etanol produzido no mundo é obtido a partir de fermentação, a parte restante vem da síntese química do etileno derivado do petróleo. A aplicação da biomassa em novos processos para o desenvolvimento biotecnológico, utiliza áreas da enzimologia, com microrganismos geneticamente modificados para a produção do etanol, atualmente é uma das aplicações mais importantes no processo fermentativo (LIN; TANAKA, 2006).

A geração do álcool por fermentação de açúcares por microrganismos, é um dos fenômenos mais conhecidos e estudados pela ciência, desde antigamente, onde civilizações produziam bebidas resultantes da fermentação microbiana, como também ocorre atualmente (PELCZAR et al., 1996). O que afirma este contexto foi o primeiro estudo realizado por

Antonie van Leewenhoek (1623-1723), que observou amostras de cerveja em fermentação em seu microscópio rudimentar. Já Theodor Schwann constatou que as leveduras eram responsáveis pela fermentação do álcool em vinhos e cervejas, contradizendo a teoria da decomposição química da matéria orgânica. No ano de 1815, Gay-Lussac formulou a estequiometria da fermentação (Reação 1), e Pasteur em 1863, demonstrou a fermentação alcoólica era de natureza anaeróbia. As pesquisas começaram a culminar a partir de 1900, onde já se tinha o maior entendimento sobre as reações enzimáticas responsáveis pelas transformações químicas de açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (KETCHUM, 1988; LIMA et al., 2001, VENTURA, 2007).

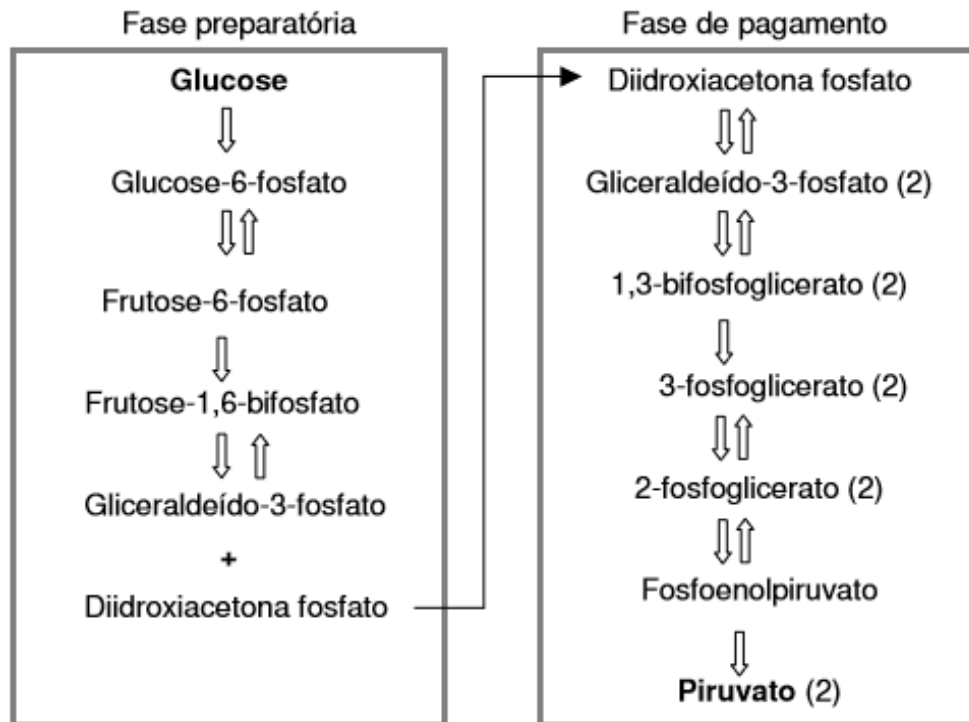
**REAÇÃO 1.** Reação estequiométrica da fermentação etanólica.



Fonte: VENTURA, 2007.

No termo geral a fermentação evidencia a degradação anaeróbia da glucose, ou outros carboidratos, em vários produtos, de acordo com a características de diferentes organismos, para obter energia na forma de ATP (Reação 2). Ocorre a quebra da glucose em duas moléculas de piruvato é o mecanismo biológico mais antigo para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis. Ao decorrer da evolução do curso, essa rota bioquímica foi conservada.

**REAÇÃO 2** - Esquema resumido da glicólise.

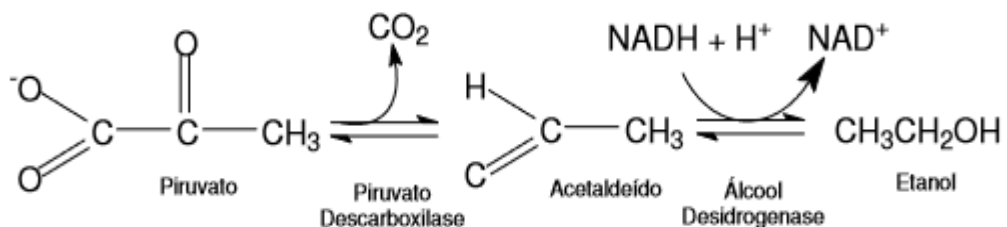


Fonte: VENTURA, 2007.

O piruvato pode ter três destinos, mas o produzido na glicólise depende do tipo de microrganismo e das rotas metabólicas.

No caso das leveduras, o piruvato é convertido em etanol e  $\text{CO}_2$  em um processo de dois passos: na 1ª reação o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, na 2ª reação, a ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH (Reação 3). A levedura transforma glucose em etanol e  $\text{CO}_2$  e não em lactato (LEHNINGER et al., 2000).

### REAÇÃO 3 - Destino do piruvato na fermentação alcoólica na levedura.



Fonte: VENTURA, 2007.

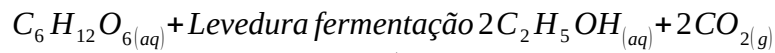
As leveduras fermentam vários açúcares, nestes estão inclusos os monossacarídeos glucose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os



trissacarídeos rafinose e maltotriose. Os açúcares como amido e celulose são polissacarídeos que não são metabolizados por leveduras (RUSSEL, 2003).

Os agentes fermentativos agem de acordo com a necessidade de gerar energia para a sua sobrevivência. Sendo assim, para as leveduras se desenvolver, o carboidrato oferecido deve estar na forma de mono ou dissacarídeos, pois os microrganismos consomem estes para a produção de ATP e como consequência a molécula de glicose é transformada em álcool com desprendimento de CO<sub>2</sub> (BAI, et. al., 2008). A reação envolvida no processo de fermentação visando à produção de etanol está apresentada na Equação 1 (SOLOMONS, 1999).

**EQUAÇÃO 1** - Reação envolvida no processo de fermentação do etanol.



Fonte: LOPES, A. C. (2013)

A fermentação alcoólica constitui em seu processo basicamente três importantes etapas: fermentação preliminar (multiplicação das leveduras), onde esta etapa deve ser curta para adaptação da levedura ao meio; fermentação principal (desprendimento de gás carbônico), nesta etapa ocorre intensa formação de álcool no meio (JUSTINO; MUTTON; MUTTON, 2005).

Segundo Janzanti (2004), a principal etapa do processo de obtenção de aguardente é a fermentação principal, nesta etapa ocorre formação de álcool decorrente da transformação de compostos, como o açúcar presente no mosto, já o gás carbônico e outros produtos são responsáveis pela qualidade e defeito do produto.

O processo produtivo de aguardente é realizado principalmente, por batelada e utiliza matérias primas açucaradas, entre elas o melaço e caldo de cana, e como agente fermentador a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mas outros microrganismos podem ser utilizados (DORNELLES; RODRIGUES, 2006).

Em alguns estudos como no de Cherubin (2003), observa-se o comportamento fisiológico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, e a queda da viabilidade celular era resultado de estresses provocados pela ação da temperatura, teor alcoólico, autólise e liberação de aminoácidos, esses fatores propiciaram a elevação da contaminação de bactérias e o estresse térmico.

Um fator importante no processo fermentativo é a temperatura, pois as leveduras são

mais eficientes quando trabalham na faixa de temperatura entre 26 e 32°C (SILVA, 2000). Os autores Stupielo e Hiorii (1981) e Nogueira e Venturini-Filho (2005) relatam que temperaturas inferiores a 30-32°C prolongam o tempo de fermentação, levando à redução significativa na atividade fisiológica das leveduras. Em outro estudo Angelis (1992) relata que em que temperaturas abaixo das consideradas ideais é necessário um maior gasto de energia para que a levedura complete o ciclo celular, podendo observar a redução do crescimento e incremento do tempo de geração.

Em relação a temperaturas muito elevadas, superiores a 40°C, ocorre o enfraquecimento do fermento ocasionando a inibição do crescimento celular, onde a maior levedura deixa de se multiplicar, sendo assim, perdendo a viabilidade principalmente na presença do elevado teor de etanol. De modo semelhante esses autores observaram que essas condições são ótimas para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, além da perda de álcool ocasionado pela evaporação, e produção de diversos metabólitos.

A ocorrência da fermentação do meio é um fator pré-determinado pela concentração de açúcares presentes, pois elevados teores no substrato leva a inibição da síntese de enzimas respiratórias, causando a inatividade da mitocôndria celular. Este efeito de repressão da respiração das células de levedura é conhecido como Efeito Crabtree, este efeito sobre as células ocorre graças a elevadas concentrações de açúcares (LEHNINGER, 2000).

A presença de microrganismos contaminantes também afeta de forma direta a fermentação, pois estes não foram selecionados para a condução da produção de álcool, as quais destacam-se fungos, bactérias e leveduras, prejudicando o processo e o tempo de fermentação que acabam se estendendo (CABRINI; GALLO, 1999). Entretanto a contaminação bacteriana é considerada o maior agente estressante do processo, pois ela compete com a levedura, consumindo os açúcares presentes no mosto (AMORIM, 1996), o que conseqüentemente, observa-se prejuízos no rendimento da fermentação já que esses degradam o açúcar do meio liberando metabólitos indesejáveis, como os ácidos orgânicos que podem agir como inibidores da fermentação, e também causando a floculação do fermento pela formação de bolhas e espumas (YKOYA, 1991; MUTTON, 1998).

Os microrganismos em destaque responsáveis pela redução no rendimento da fermentação alcoólica são as bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Streptococcus* (AMORIM; OLIVEIRA, 1982), *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Lactobacillus*, e os fungos (leveduras e bolores) como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* (BEVAN; BOND,

1971) e *Candida* (CABRINI; GALLO, 1999).

#### 4.5. Fermentação Alcoólica

A conversão de substrato oxidado (açúcares) em substrato reduzido (etanol), ocorre no interior de microrganismos capazes de realizar a fermentação alcoólica, reações bioquímicas reguladas por enzimas. Quando o substrato é parcialmente oxidado gera um composto orgânico reduzido, o que garante energia para a produção e manutenção celular garantindo um equilíbrio oxidativo.

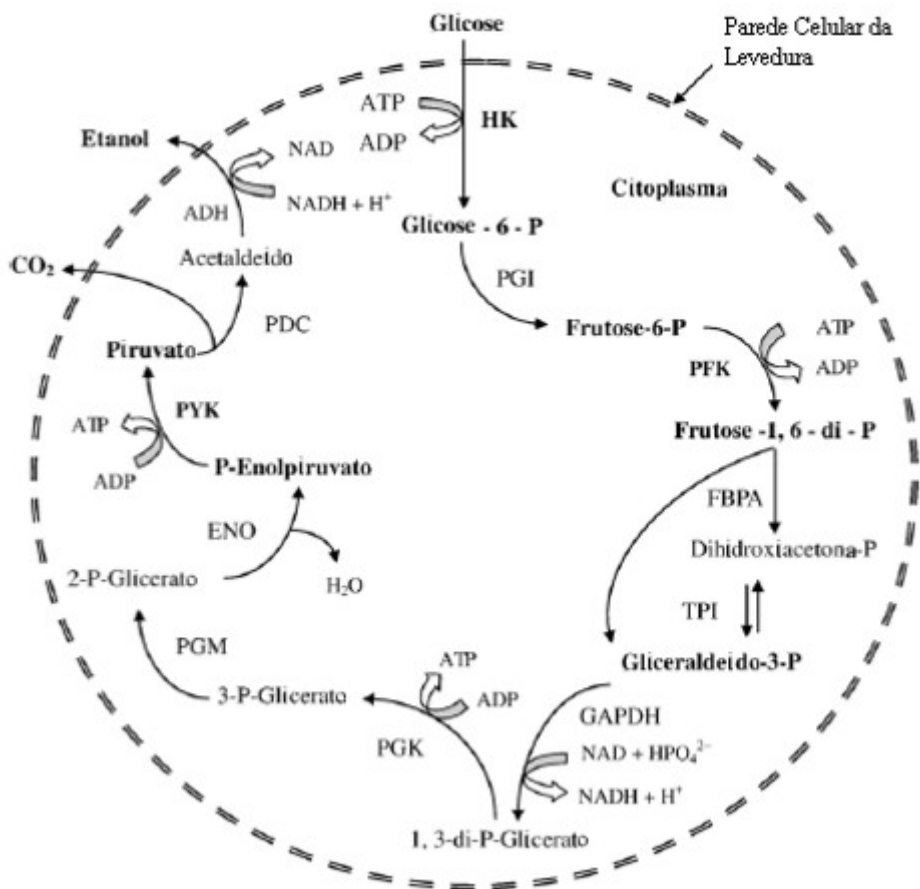
De maneira histórica, os microrganismos mais utilizados no processo de fermentação alcoólica têm sido as leveduras do gênero *Saccharomyces*, dentre essas, *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie. Estas leveduras são consideradas como GRAS (generally recognized as safe), podendo ser usadas como aditivo em alimentos para consumo humano e, portanto, ideal para a produção de bebidas alcoólicas e fermento de pão. Entretanto outras leveduras e algumas espécies de bactérias tem capacidade de produzir etanol como exemplo, *Zymomonas mobilis*.

Os açúcares fermentescíveis pelas leveduras são, glicose, frutose, manose e galactose, que são os monossacarídeos, bem como os dissacarídeos, maltose, sacarose, também os trissacarídeos como rafinose e maltotriose, o que depende da capacidade da cepa. Já o amido e a celulose são polissacarídeos não metabolizado pelas leveduras (RUSSELL, 2003).

Com o uso de ferramentas de biologia molecular, diversas linhagens recombinantes de *Saccharomyces* são estudadas e desenvolvidas para a produção de etanol, fazendo assim possível a construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de crescer com o amido como principal fonte de carbono, por introdução de genes de amilases. Esses trabalhos buscam inserir genes para produção de enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilase e glucoamilase), visando construir cepas de leveduras capazes de degradar e hidrolisar o amido (ASHIKARI et al., 1986; MORAES et al., 1995; SHIGECHI et al., 2004; CHENG et al., 2011).

Na produção do etanol a principal via metabólica utilizada pelas leveduras, é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula, como mostra o esquema da Reação 4 a seguir (BAI et al., 2008).

**REAÇÃO 4.** Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*.



Fonte: BAI et al. (2008).

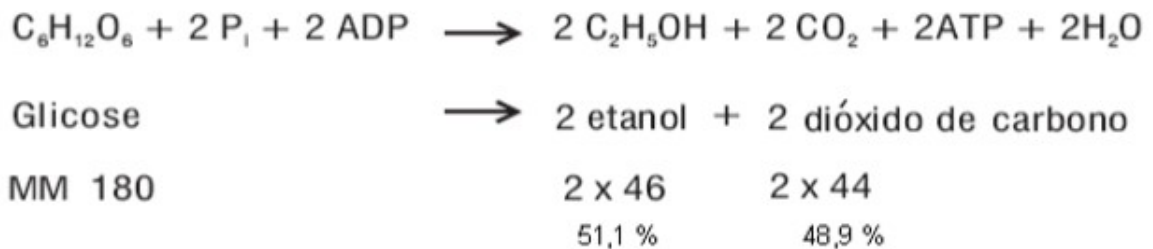
Abreviações: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase.

As leveduras são consideradas capazes de crescer na presença ou na ausência de oxigênio, ou seja, são anaeróbios facultativos. Quando o oxigênio é suficiente e a concentração de substrato é baixa, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), com o oxigênio comoceptor final de elétrons. A utilização dos açúcares ocorre para que haja produção de energia e crescimento celular, mas quando há a ausência de oxigênio (anaerobiose) ou alta concentração de glicose, o etanol é o principal produto final. Sendo assim a *Saccharomyces cerevisiae* pode alternar de respiração para fermentação alcoólica, onde em condições aeróbias é o único modo de produção de energia. No entanto, a fermentação alcoólica pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio,

conforme o efeito denominado Crabtree (CRABTREE, 1928), se a concentração de glicose ultrapassa um valor limite crítico (que depende do microrganismo e da cepa de levedura), devido à inibição da síntese de enzimas respiratórias (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986).

Deste modo em condições anaeróbias ou em elevada concentração de glicose, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de dióxido de carbono. Em tese, pode ser obtido até 51,1 % de etanol e 48,9 % de CO<sub>2</sub> em base mássica, em relação à glicose metabolizada, e, ainda, são produzidos na glicólise dois moles de ATP (adenosina tri-fosfato) por mol de glicose, usados para a manutenção energética das células, conforme ilustrado na Reação 5 a seguir:

**REAÇÃO 5.** Manutenção energética das células, piruvato reduzido a etanol com a liberação de dióxido de carbono.



Esta equação química mostra que a glicose produz partes aproximadamente iguais de dióxido de carbono e etanol e ainda libera energia. Parte da energia é usada para o metabolismo celular e parte é perdida na forma de calor. Esta relação, porém, ignora que parte da glicose será destinada para o crescimento da levedura e que existem outros metabólitos produzidos (RUSSELL, 2003).

Alguns subprodutos, tais como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores, são produzidos em pequena quantidade em relação à quantidade de etanol, pois a produção destes, bem como o crescimento e manutenção celular, inevitavelmente, direciona intermediários da via glicólica para as vias metabólicas correspondentes, diminuindo a produção de etanol. A eficiência de conversão em etanol na indústria é calculada tendo como referência o rendimento de 51,1%, chega a 90-93 %, devido ao crescimento celular e à produção de produtos finais de metabolismo secundário (INGLEDEW, 1999).

O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica da *Saccharomyces cerevisiae*, com o papel de manter o balanço redox citossólico da célula, especialmente em condições anaeróbias, compensando as reações celulares produzidas (NADH VAN DIJKEN & SCHEFFERS, 1986). O glicerol atua, ainda, na pressão osmótica do meio e seu acúmulo é muito importante para a sobrevivência durante o estresse osmótico. O aumento da

temperatura, entre outros estresses, faz com que a célula de levedura produza maiores quantidades de glicerol. Industrialmente, em uma fermentação de etanol combustível, os níveis de glicerol podem chegar a 15 g/L (RUSSELL, 2003).

O principal produto secundário entre os ácidos orgânicos é o ácido succínico, resultante final da fermentação alcoólica. O ácido pirúvico, málico, fumárico, oxalacético, cítrico,  $\alpha$ -cetoglutárico, glutâmico, propiônico, láctico e acético também são produzidos durante a fermentação alcoólica, mas em quantidades ainda menores. Alguns destes ácidos orgânicos são acumulados devido às enzimas que atuam na operação limitada do ciclo do ácido cítrico. Muitos destes ácidos podem afetar bebidas fermentadas, alterando o sabor, podendo, ainda, ser convertidos em ésteres (INGLEDEW, 1999).

#### **4.6. Produção e Usos Alternativos do Mel**

A produção mundial do mel tem uma tendência crescente dentro das exigências de padrões elevados pelos consumidores. Essa progressiva sofisticação leva a regulamentação do mercado reduzindo o espaço para novos produtores, que tendem a atender todas as normas técnicas, onde muitos originam de países com frágeis estruturas de produção, comercialização e vigilância sanitária (BRASIL, 2007).

De acordo com Pereira et al. (2003), em 1983 houve um aumento na produção de mel, apesar de variações em diversos países industrializados, esta crescente demanda é atribuída ao aumento do número de colmeias, mas também por maior interesse da população por produtos naturais e saudáveis.

O crescimento da produção de mel brasileiro é muito significativo, devido à diversificada flora em toda extensão territorial e pelas condições climáticas marcantes e favoráveis, o que possibilita a produção de mel uma vez por ano (ARRUDA et al., 2004).

Segundo Paula (2008) o Brasil tem domínio no cenário apícola devido ao controle na metodologia aplicada e no manejo das abelhas africanizadas. Essas abelhas são muito resistentes a doenças, e dispensam uso de medicamentos. E a diversidade da flora natural livre de contaminantes agrotóxicos dá ao país uma vantagem em relação aos demais países concorrentes.

O amadurecimento na atividade apícola visto de maneira profissional mostra que ainda existe grande potencial não explorado que pode aumentar a produção e incrementar o agronegócio (LEGLER; RATHMANN, 2006).

O mel vem sendo testado com êxito, principalmente na mistura em alguns produtos, como iogurte e biscoitos pela indústria alimentícia, devido às suas qualidades antissépticas e

cicatrizantes. Além da vasta utilização na indústria alimentícia destacasse também como base de diversos produtos de higiene e cosméticos como: xampu, condicionadores, sabonetes, cremes, loções e óleos (ALMEIDA; CARVALHO, 2009).

O mel é considerado um ingrediente de autovalor e funcional para os cervejeiros. O tipo de cerveja que se pretende produzir, com características sensoriais do mel, vai depender da etapa do processo em que o mel será adicionado, da quantidade do mel a se acrescentar e do tipo de mel utilizado. Segundo os autores estudo sensoriais revelam que o mel diminui a percepção de acides e o sabor amargo da bebida.

Brownig, Walker III e Hansen (2010) relatam o uso do mel na produção de cerveja, onde os açúcares de que é constituído contribuem com um aroma e o sabor próprio, o que torna o atrativo ao consumidor assim agregando valor ao produto. De acordo com os autores do ponto de vista técnico, para o processo de fabricação da cerveja pode ser usado qualquer tipo de mel, pois cada tipo de mel contribui para o produto final com características sensoriais diferentes.

A produção de bebidas alcoólicas como a aguardente de mel é apresentada como uma forma de otimização no aproveitamento do mel que não se enquadra aos padrões exigidos pela legislação em vigor (SBRT, 2010).

Nas áreas rurais são desenvolvidos muitos produtos como a cera de abelha, a própolis, o pólen a geleia real com maior valor agregado que o mel, ainda que em pequeno volume é um complemento a renda dos apicultores, a apitoxina, a manteiga com mel, o iogurte com mel, os locores, os doces, os sorvetes, os cosméticos, o hidromel entre outros (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991, SEBRAE, 2010)

O hidromel é uma bebida alcoólica tradicionalmente resultada da ação fermentativa das leveduras do gênero *Saccharomyces* no mosto do mel diluído em água enriquecida de sais minerais (CRANE, 1993; AQUARONE et al., 2007; NAVRÁTIL et al., 2001). Já na legislação nacional (BRASIL, 1997) é dada a seguinte definição: hidromel é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% em volume, a 20°C, obtida pela fermentação alcoólica de uma solução de mel de abelha, sais minerais e água potável. Podendo ser classificado em seco, licoroso, doce e espumoso, segundo sua tecnologia de fabricação.

No Brasil o hidromel pode ser produzido em diferentes regiões de maneira artesanal sem equipamentos sofisticados, quando comparados a atual produção de vinhos de uva (MATTIETTO et al., 2006).

Nos trabalhos de Cheung e Gerber (2009) e Dantas et al. (2009), eles verificaram que os consumidores do mel de abelhas associam seu consumo ao bom funcionamento do

organismo com as propriedades do alimento/medicamento.

A utilização do mel também tem sido em larga escala como ingredientes em alimentos, como constituinte de nutracêuticos e na linha de cosméticos (SATO; MIYATA, 2000; HOSNY; EL-GHANI; NADIR, 2009). De acordo com Matsuda e Sabato (2004) o mel é bem aceito em preparações como medicamentos, temperos para saladas, por ser considerado um alimento prebiótico é utilizado na indústria de laticínios, bebidas, doces e produtos confeitados.

Trindade et al. (2007) introduziram a glicose de mel silvestre no sorvete, e avaliaram aceitabilidade, como forma de implementar o mel na alimentação. O uso do mel como substituto da glicose de milho não alterou a qualidade do sorvete, o atributo deu-se ao valor nutricional agregado.

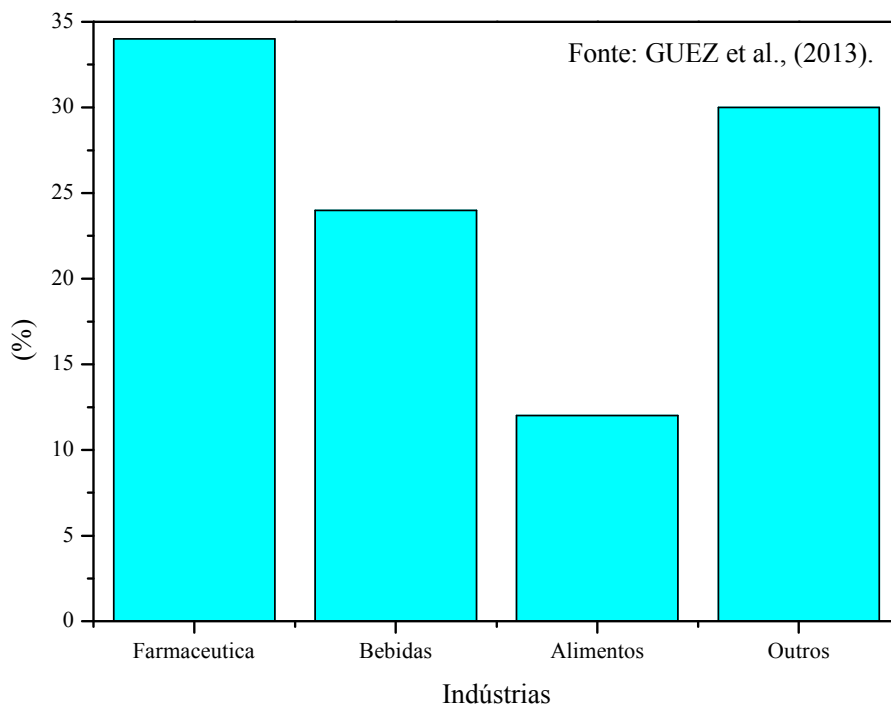
A crença de efeitos curativos e cicatrizantes do mel se faz nos dias atuais, quando acrescentados em várias receitas medicas no tratamento, limpeza e cicatrização de feridas infectadas por microrganismos, já que estudos apresentam seu potencial antimicrobiano relacionado ao seu efeito osmótico devido a concentração de açúcares (MOLAN, 1992; SHEIKH et al., 1995).

Segundo Alves et al. (2008) sugeriram em ensaios com ratos *Wistar* submetidos à exérese de pele, que parte é da eficiência do mel de abelha em melhorar a cicatrização de feridas, mas também pode se atribuir a ação da defesa imunológica orgânica tecidual, além da sua atividade microbiana e seus efeitos regulatórios sobre a cicatrização das feridas, relacionados aos açúcares, fatores ainda desconhecidos induzam a liberação de citocinas.

Amendola et al. (2003) concluíram que o mel é realmente adequado como conservante de ossos, ao avaliar a conservação do osso canino em mel, como implante em defeitos ossos em cães, onde o mel manteve o material livre de agentes patogênicos preservando a rigidez óssea.

Mediante ao interesse nacional e internacional pelo mel e sua aplicação em diferentes áreas indústrias, os autores Guez et al., (2013) realizaram um estudo de prospecção para avaliar o panorama mundial da proteção de processos e produtos relacionados ao mel e especificamente associado a produtos alcoólicos, relacionando os documentos de patentes depositados, pesquisadores e países que realizam o depósito de patentes, assim como, em qual área industrial está sendo explorado o mel associado com álcool para preparo de formulações alimentícias, farmacêuticas, etc. A Figura 1 a seguir revela a distribuição das principais áreas tecnológicas de aplicação de produtos de mel associados ao álcool.





**FIGURA 2.** Principais áreas tecnológicas de aplicação de produtos de mel associados ao álcool.

De acordo com este estudo percebe-se que o mel e produtos associados ao álcool estão agrupados na sua maior parte na indústria farmacêutica e na área de alimentos e bebidas, concluindo que a tendência de depósito de patentes na área de mel e derivados, está em verdadeira ascensão, por se tratar de um produto natural, com múltiplas características funcionais que se enquadram nas exigências do mercado consumidor. Independente da forma comercial que é apresentado, essa tendência estimula o desenvolvimento de novos produtos e tecnologias, refletindo nas diferentes áreas de aplicação (GUEZ et al., 2013).

#### **4.7. Espectrometria no Infravermelho**

A designada radiação infravermelha (IR) equivalem à parte do espectro eletromagnético situada por volta das regiões do visível e das micro-ondas. A região de maior utilidade na química orgânica corresponde ao número de onda entre  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Ainda existem regiões do infravermelho próximo  $14290$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  e do infravermelho distante  $700$  a  $200\text{ cm}^{-1}$  que tem conquistado a atenção em trabalhos na literatura atual. O número de ondas ou frequência de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das

constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN E WEBSTER, 2000).

De acordo com Silvestein e Webster (2000), desde o final da década de 90 a espectrometria com transformações de Fourier (FTIR), tem sido desenvolvida, e apresenta diversas vantagens em relação aos instrumentos que apenas utilizam a espectrometria de infravermelho por dispersão. Tais vantagens podem ser citadas como a não utilização de monocromadores, sendo a totalidade da faixa de radiação passando simultaneamente pela amostra, gerando um enorme ganho de tempo, e também permitindo uma resolução extremamente alta do espectro, além de facilitar na manipulação dos resultados.

As bandas de interesse para este trabalho de caracterização por FTIR podem ser dadas conforme a Tabela 2.

**TABELA 2.** Bandas de absorção em regiões de interesse para os compostos químicos-infravermelho.

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Característica da banda</b>
650 - 900	Presença de aromáticos
2840 - 3000	Parafínicos - Deformação axial de C-H
1350 - 1500	Parafínicos - Deformação angular C-H
721	Parafínicos - Deformação angular assimétrica de CH <sub>2</sub>
2990 - 3100	Naftênicos - Deformação axial de C-H
1442 - 1468	Naftênicos - Deformação angular de C-H

1600 - 1670	Olefinicos lineares - Deformação axial de C=C
1900 - 2000	Olefinicos cumulados - Deformação axial de C=C
Acima de 3000	Olefinicos - Deformação axial de C-H
650 - 1000	Olefinicos - Deformação angular de C-H
3550 - 3620	Presença de OH livre
3200 - 3450; 1000 - 1200	Presença de OH em ligação hidrogênio
3200 - 3550; 3623; 3077; 3600; 3100	Álcoois - Deformação axial de O-H
1000 - 1260	Álcoois - Deformação axial de O-C
1330 - 1420; 650 - 769	Álcoois - Deformação angular de O-H
650 - 1000; 1400; 1650 - 1700; 3000 - 3100	Presença de C=C
700 - 750; 3180 - 3220	Presença de C≡C
1580 - 1825	Presença de C=O
1000 - 1050	Presença de O=S=O
1150 - 1180; 1250 - 1280	Presença de SH
1300 - 1400; 1500 - 1600	Presença de NO <sub>2</sub>
700 - 750; 3180 - 3220	Presença de C≡N
3220 - 3580	Presença de NH <sub>2</sub> NH
2350	Deformação axial assimétrica de CO <sub>2</sub>

---

Fonte: Silverstein e Webster, 2000.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de mel para a fermentação foram de quatro méis silvestres em estágios diferentes de armazenamento, de um único fornecedor, da cidade de Prudentópolis – PR (25° 12' 47" S, 50° 58' 40" O) da empresa Multi Flora. A data de acondicionamento dos méis esta identificada nas embalagens, que marcam de maio de 2015, respectivamente destinadas em potes de 1 kg.

As Figuras 3 e 4 a seguir, apresentam imagens das amostras de resíduo de mel em diferentes estágios de fermentação no momento da coleta.



**FIGURA 3.** Imagens das amostras de resíduo de mel em diferentes estágios de armazenamento no momento da coleta.



**FIGURA 4.** Imagem das Amostras de resíduo de mel silvestre em diferentes estágios de armazenamento. (Respectivas amostras: D, A, B e C).

### 5.1. Avaliação dos Parâmetros Físico-Químicos:

Para a produção de álcool a matéria prima utilizada foram quatro amostras de resíduo de mel silvestre em diferentes períodos de fermentação, com características visivelmente diferentes, um mel claro outro escuro, um com formação de bolhas e cristalização. Para a avaliação das amostras foram efetuados testes físico-químicos para posteriormente

fermentação com a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 5.2. Potencial Hidrognênico (pH)

A determinação do pH foi realizada pelo método do papel indicador de pH (Merck). O papel foi imerso nas amostras de mel e determinou-se o valor de pH pela comparação da coloração do papel indicador mergulhado nas amostras com o padrão que acompanha os papéis indicadores.

### 5.3. Açúcares Redutores (AR)

Para a determinação de açúcares redutores (AR) nas amostras de mel foi utilizada a metodologia analítica de titulação de Lane-Eynon, que consiste no uso do licor de Fehling (solução A + solução B). No método supracitado, o  $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}$ , azul característico do íon cúprico do reativo de Fehling (solução alcalina de sulfato de cobre em tampão de tartarato duplo de sódio e potássio) é reduzido a óxido cuproso  $\text{Cu}^{+}_{(aq)}$ , um precipitado de óxido de cobre de coloração tijolo. Para proceder à determinação de AR, foram preparadas as soluções de Fehling A, composta de sulfato de cobre e hidróxido de sódio, e Fehling B, composta de sal duplo de tartarato de sódio e potássio, com a função de complexar os íons de cobre na solução. Ao proceder o aquecimento destas soluções, ocorreu a oxidação dos açúcares bem como a redução do cobre, resultando no precipitado da titulação (TAVARES et al., 2010).

O Licor de Fehling foi obtido na titulação por meio da mistura das soluções A e B. A solução A foi obtida pela dissolução de 34,639g de sulfato de cobre penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em 500 mL de água destilada. A solução B foi obtida pela dissolução de 173g de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 250 mL de água destilada e 250 mL de solução de hidróxido de sódio a 20% (m/v), preparada pela dissolução de 50 g de NaOH em 250 mL de água destilada. As soluções de Fehling A e B foram padronizadas com uma solução de D-glicose a 1% (m/v), a qual foi o analito no interior da bureta.

Procedeu-se a titulação para padronização dos Fehling, sendo esta realizada em triplicata e o valor médio do volume gasto foi utilizado para determinar o Fator de Fehling (F), o azul de metileno indica o ponto final da titulação. Como mostra a Equação 2 a seguir:

**EQUAÇÃO 2** - Padronização dos Fehling.

$$F = \frac{V \cdot P}{100}$$

Em que F = fator dos Fehling; P = massa da amostra; V = quantidade de mL gastos na titulação.

Para a determinação de açúcares redutores (AR), procedeu-se as titulações, onde a amostra da Figura 3 foi gotejada na mistura dos Fehling (solução de Fehling A + solução de Fehling B). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A Equação 3 mostra o cálculo realizado para esta determinação:

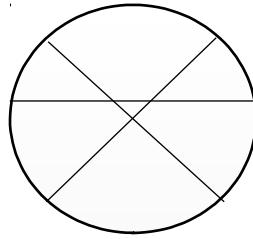
**EQUAÇÃO 3** - Determinação de açúcares redutores (AR).

$$AR = \frac{100 \cdot A \cdot F}{V \cdot P}$$

Onde: A = diluição da amostra; F = padronização dos Fehling, Fator Fehling; P = massa da amostra em g; V = volume em mL gastos na titulação.

**5.4. Teor de açúcar na escala Brix**

Este método científico, constitui-se de um método físico para medir a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma amostra. Baseia-se em um sistema de graduação de aparelhos especialmente para ser utilizado na indústria açucareira, mais precisamente na análise de açúcares em geral que estejam em solução. As análises foram feitas de acordo com Spencer e Mead (1945). As amostras preparadas a uma concentração final de 1% foram aplicadas diretamente no aparelho a uma temperatura de 25°C e feita as leituras (SILVA, et al., 2003). Para determinação do °Brix, a amostra foi colocada no refratômetro e estimado seu valor quando a o valor atingia a metade, como representado na Figura 5:



**FIGURA 5:** Desenho representativo da análise de °Brix.

## 6. Cultivo da bactéria *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* utilizada foi a cepa padrão ATCC 25922, desidratada por processo de liofilização, e armazenada a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para manter a estabilidade genética e garantir a ausência de contaminação. As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido específico para o seu crescimento, contendo peptona, lactose, bile bovina, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico. Posteriormente, foram incubadas em estufa bacteriológica, a temperatura de  $36^{\circ}\text{C}$ , em pH neutro.

## 7. Pasteurização

As quatro amostras de resíduo de mel foram submetidas a tratamento térmico (pasteurização) conforme a portaria nº6 de 25 de julho de 1985 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Após a pasteurização foi retirada uma alíquota de cada amostra (pasteurizada e *in natura*) para a realização das análises. Posteriormente acondicionados em recipientes estéreis e armazenados em geladeira a  $6^{\circ}\text{C}$ , baseado na técnica de Bauer et al. (1966). Na pasteurização do mel respeitaram-se os seguintes tempos e temperaturas apresentados na Tabela 3:

**TABELA 3.** Pasteurização das amostras do resíduo de mel.

<b>Tempo</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
470 min	52
170 min	54,5
60 min	57
22 min	59,5
10,3 min	65,5
1 min	68
24 seg	71,1

## 8. Fermentação

A fermentação dos resíduos de mel foi realizada utilizando as seguintes condições: a

quantidade de mel para produção de mosto com 10 Brix foram adicionados em 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada, e adicionado 10% de *E. Coli* V/V, tempo de fermentação de 0 a 120 horas e temperatura de 36°C.

Uma amostra para o branco foi preparada pela dissolução de 13 g de mel em 50 mL de H<sub>2</sub>O para a determinação do teor de álcool gerado pela fermentação natural do resíduo.

O processo fermentativo dos resíduos de mel ocorreu em três tipos de métodos; onde inicialmente utilizou-se [erlenmeyer](#) e kitassato para o processo semi anaeróbico em estufa. O terceiro método aplicado foi com erlenmeyer em câmara de anaerobiose.

A Figura 6 a seguir, apresenta a ilustração dos métodos utilizados: (1) erlenmeyer e (2) kitassatos interligados, no processo semi anaeróbico em estufa, (3) erlenmeyer em câmara de anaerobiose.



**FIGURA 6.** Ilustração dos métodos utilizados para fermentação em processo semi anaeróbico em estufa e câmara de anaerobiose.

## 9. Destilação

A separação do álcool do concentrado fermentado pela *E. coli* foi realizada por sistema de destilação simples. A separação ocorreu por diferenças entre os pontos de ebulição, onde a temperatura ideal para destilação do etanol foi de 70 °C.

O mosto foi adicionado ao balão de destilação e aquecido na manta térmica à temperatura de 70 °C. O processo de destilação ocorreu por um período de aproximadamente 2 h, até o ponto em que se conseguiu manter a temperatura constante em 70 °C, após o início de variação da temperatura a destilação foi interrompida.

## 9. Quantificação do Teor de Etanol no Destilado Bruto (°GL)

Para determinação do teor de etanol foi utilizado um refratômetro da marca [Kasvi](#) e modelo K52-080 Uma gota contendo o álcool destilado foi adicionada ao refratômetro e foi



determinado o teor de álcool por meio da leitura direta da escala.

### **10. Caracterização do etanol**

Para a análise físico-química do álcool obtido, foi utilizado o método analítico de espectroscopia de infravermelho com aplicação da técnica de transformadas de Fourier (FTIR-ATR) com fluoreto de cálcio. O método tem como característica a determinação dos grupos funcionais do material. A análise se baseia na técnica de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas. Os espectros foram obtidos na faixa do infravermelho entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

## 11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 11.1. Caracterização Físico-Química

A Tabela 4 apresenta as características físico-químicas determinadas para os resíduos de méis silvestre estudados. Os resultados obtidos são a média da triplicata.

**TABELA 4.** Características físico-químicas dos resíduos de méis silvestres oxidados.

<b>Características</b>	<b>Amostra A</b>	<b>Amostra B</b>	<b>Amostra C</b>	<b>Amostra D</b>
<b>pH</b>	6 ± 0,00	6 ± 0,00	6 ± 0,00	6 ± 0,00
<b>AR (%)</b>	81,9 ± 0,20	54,4 ± 1,10	43,4 ± 0,71	67,2 ± 0,62
<b>°Brix Total (%)</b>	77,0 ± 2,00	55,7 ± 0,15	70,6 ± 0,20	50,8 ± 1,06
<b>°GL (%)</b>	17,5 ± 0,50	14,0 ± 0,90	17,0 ± 0,30	12,0 ± 0,30

Os valores de pH determinados indicam que não houve variação deste parâmetro quando é feita a comparação entre os resíduos de mel, entretanto, os valores não estão de acordo com a literatura. Os autores Bogdanov (1997), Oddo e Piro (2004), afirmam que o pH do mel pode variar entre 3,5 e 5,5, devido a presença de ácidos orgânicos. A diferença entre os resultados deste trabalho com aqueles da literatura, pode estar relacionado com a diferença de qualidade do mel deste estudo, pois se trata de resíduo de mel.

Este pH básico obtido pelas amostras de resíduo também pode estar relacionado com a acidez livre devido a ocorrência de ação de tamponamento de ácidos e minerais que estão presentes no meio (IURLINA; FRITZ, 2005) variando entre 0,04% em méis claros e 0,2% em méis escuros (ANKLAM, 1998), em pequenas quantidades de cálcio, magnésio, sódio, cobre, ferro, manganês, enxofre, chumbo, zinco, fosforo, potássio que são os minerais mais abundantes no mel (BOGDANOV et al., 1997, OLLAITAN et al., 2007).

A análise de pH não é obrigatória para avaliação da qualidade do mel, no entanto, foi realizada como parâmetro complementar para a avaliar a acidez total. Segundo Crane (1993) o valor de pH pode estar relacionado com a composição floral das áreas de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar, além das diferenças na composição do solo ou a associação de espécies vegetais para a composição final do mel. O que torna evidente que esses fatores estão relacionados com o resíduo de mel.

Os valores ideais do pH recomendado para o processo fermentativo estão na faixa de 3,5 a 4,5. Angelis (1992) também cita que as leveduras são células acidófilas, ou seja, são tolerantes a variação do pH, e podem trabalhar em faixas de pH variantes entre 2,4 a 8,6.

Sendo assim dados relevantes, o que torna os resíduos de méis com pH 6, atrativo para

o processo fermentativo com a utilização de leveduras, já que estas podem trabalhar em faixas variáveis de pH.

A matéria prima com pH 6 podem ser ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, pois Gallo e Canhos (1991) relatam que devido aos altos teores de nutrientes orgânicos como glicose e frutose, e inorgânico como nitrogênio, fósforo e potássio, alta atividade de água, pH superior a 4,5, além da temperatura utilizada nos processos industriais de fermentação, propiciam o crescimento desses organismos.

Em relação aos critérios de composição, tanto no resíduo de mel claro quanto no resíduo de mel escuro, não estão de acordo com os valores estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro, pois as diferenças entre as amostras quanto a sua cor escura, verifica-se que, méis escuros apresentam pH mais básico, já que a lei implica em um pH mais ácido para méis claros, sendo assim, os resíduos de mel apresentam menor acidez quando comparados aos méis que se enquadram nas exigências.

Os valores de porcentagem de açúcares redutores foram menores, do que os encontrados por Olaitan et al. (2007), que avaliaram os constituintes maioritários do mel, os hidratos de carbono, que correspondem cerca de 95% a 99% da matéria seca. Os hidratos de carbono são (38,4%) de frutose, (1,3%) de sacarose e cerca de 12% de outros (IURLINA; FRITZ, 2005). Isso ocorreu provavelmente pelo consumo de açúcares do processo fermentativo, causado por microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras considerados microbiota normal dos méis e estão relacionados à segurança deste alimento, pois se envolvem em atividades de deterioração, produção enzimática, toxinas, produção de vitamina e aminoácidos que estão relacionados a fatores de crescimento e inibição de microrganismos competitivos, além da conversão metabólica dos alimentos (SILVA et al., 2008).

Pela técnica de cromatografia realizada por Lazaridou et al. (2004), estudaram a composição dos açúcares e encontram em suas amostras de méis níveis relativamente baixos de sacarose o que indica que a seleção do mel ocorreu em estágio avançado de maturação, podendo relacionar este estudo com as amostras residuais, já que se encontram em estágio de oxidação avançado.

Segundo Anklam (1998) o conteúdo superior de açúcar no mel escuro (71,43%) pode estar relacionado a proporção de glicose e frutose. Este estudo fornece indicações sobre o estado de cristalização do mel, ou seja, quando o conteúdo de frutose é superior ao de glicose o mel apresenta-se fluido (DE RODRIGUES et al., 2004; FINOLA et al., 2007). Sendo assim como as amostras residuais (D e C) analisadas se apresentavam fluidas (Figura 8 e 9 da

metodologia), provavelmente o conteúdo de frutose destes são superiores ao de glicose em relação às amostras residuais (A e B), já que estas apresentam-se no estado cristalizado.

A presença de água no mel é um fator influente nos processos indesejáveis, Lazaridou et al. (2004). Gleiter, Horn e Isengard (2006), afirmam em seus estudos que o mel no estado cristalizado apresenta maior teor de água, e que a atividade da água depende principalmente do teor de glicose, pois o aumento do teor de água em soluções supersaturadas de glicose em fase líquida tem tendência a cristalizar, o que permite que os microrganismos se multipliquem ocorrendo a fermentação, descrevendo o provável acontecimento com as amostras. Entre todos os resultados, a amostra residual (A), foi a mais significativa, pois apresentou 81,9% de açúcares redutores, a qual provavelmente tenha maior conteúdo de glicose, por se apresentar no estado cristalizado.

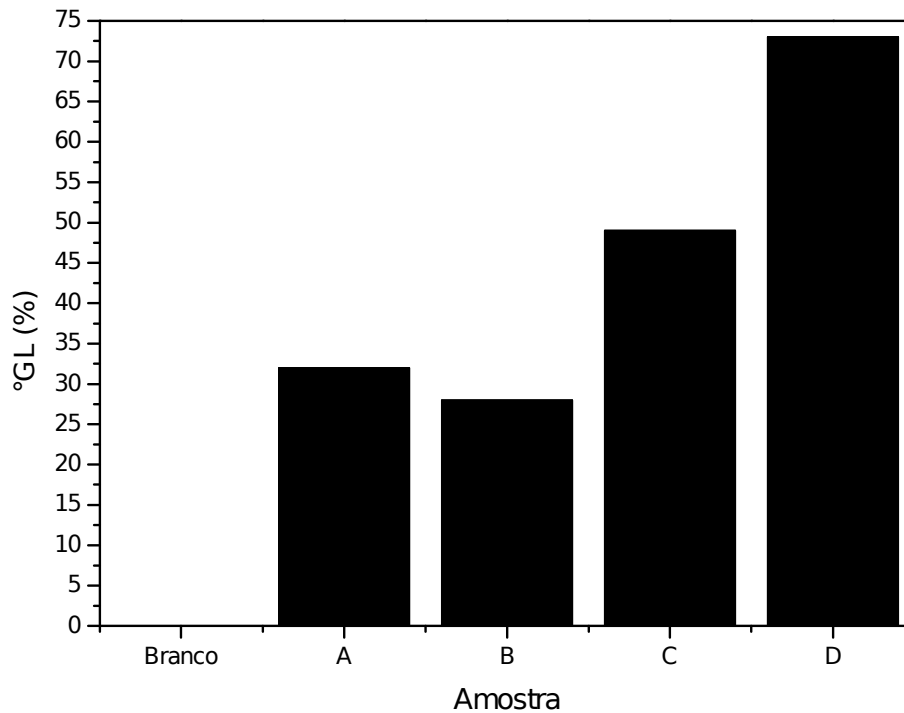
O teor de açúcares redutores é uma informação fundamental para que o mosto possa ser preparado de forma correta, pois, estes açúcares serão convertidos em álcool pela ação da bactéria. No entanto as amostras analisadas se tratavam de resíduos, que já se encontravam em processo de fermentação evidenciando a presença de álcool, devido a ação da microbiota normal do mel. Snowdon e Cliver afirmam que a elevada contagem de leveduras encontradas no mel o tornam impróprio para o consumo, não podendo ser comercializado, devido a ocorrência da fermentação com aparecimento de ácido, gás e outros, pela utilização dos açúcares presente.

A quantificação dos açúcares redutores e do °Brix, é possível estabelecer uma avaliação e controle do processo fermentativo para produção de álcool, mas diante do estado oxidação das amostras se tornam resultados relevantes, sendo possível avaliar a conversão da amostra de modo gradativo, em que os açúcares foram convertidos em gás carbônico e álcool, como também ocorre no processo industrial para obtenção do álcool.

Os açúcares apresentam resultados semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2004), que avaliaram diferentes métodos para determinar e quantificar açúcares no mel e obteve valores que variaram de 78,3 a 85,0 °Brix. O que indica que a amostra residual (A) apresenta porcentagem (77%) menor, porém a mais próxima dos valores citados pelo autor, que apresenta maior teor de açúcares redutores quando comparado aos resultados das demais amostras.

## **11.2. Fermentação em sistema semi anaeróbico com erlenmeyer**

Na Figura 7 estão apresentados os dados para a fermentação dos resíduos de mel em sistema semi anaeróbico.



**FIGURA 7.** °GL (%) com 72 horas de fermentação e 10% de concentração de *E. coli*.

Analisando a Figura 9, é possível perceber a produção de álcool com concentração de 10% de *Escherichia coli* ao longo do tempo de 72 horas das quatro amostras de mel oxidadas (A, B, C e D).

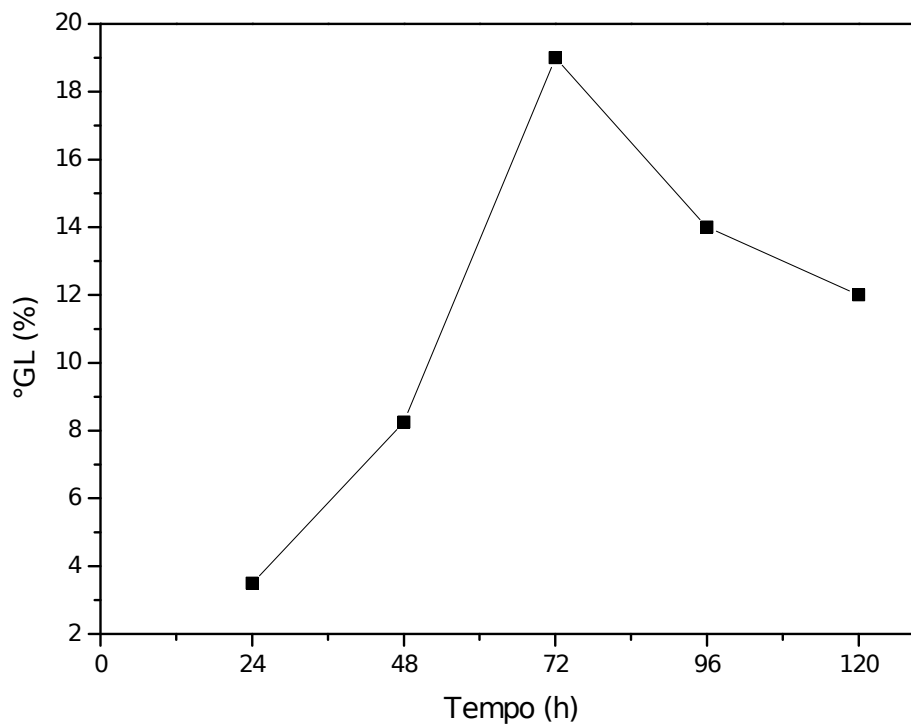
Todas as amostras de mel oxidado obtiveram o maior teor de álcool no tempo de 72 horas de fermentação com concentração de 10% de *E. coli* nos testes iniciais. Dentre as amostras a que se destaca com maior teor de álcool foi a amostra (D) com 73% (Figura 5 da metodologia), mesmo não sendo a amostra de mel há apresentar a maior porcentagem de açúcares redutores (Tabela 2 da metodologia). Considera-se que a amostra residual (D), apresentava-se, portanto, com aspecto fluido em relação às demais amostras de mel, podendo assim relacionar a frutose como um componente assimilado quantitativamente pela bactéria ao longo do tempo de fermentação. Já que a frutose é o carboidrato mais abundante na composição dos méis fluidos segundo Lazaridou et al. (2004), pois a fermentação ocorre pela transformação dos açúcares, sendo estes no mel a frutose o carboidrato mais abundante (Tabela 1 da metodologia).

Portanto os resultados de álcool obtido em concentração de 10% de *E. coli*, estão correlacionados aos resultados da concentração de açúcar de cada amostra, pois todas

apresentam uma quantidade sugestiva de açúcares (Tabela 2 da metodologia), mesmo não se enquadrando no estudo feito por Silva et al. (2004), onde em seu estudo os valores dos açúcares variaram de 78,3 a 85,0 °Brix.

### 11.3. Teor de álcool das amostras em função do tempo de fermentação

Na Figura 8 estão os resultados do teor de álcool para a fermentação da amostra de mel D. A fermentação foi realizada em erlenmeyer em sistema semi anaeróbico com concentração de 10% V/V de *Escherichia coli* ao longo do tempo de 0 a 120 horas da amostra de álcool (D).



**FIGURA 8.** °GL (%) da amostra de mel (D), obtida por fermentação em concentração de 10% de *E. coli* nos tempos de 0 a 120 horas.

É possível analisar pela Figura 8 que a produção do álcool aumentou ao longo do tempo, onde o pico fermentativo com concentração de 10% de *E. coli* foi às 72 horas, após ocorreu um declínio na produção que se estende até as 120 horas.

Esta produção ao longo do tempo das 120 horas foi de forma direta, ou seja, os açúcares existentes foram fermentados sem adição de componentes auxiliares, como ocorre na fermentação com leveduras. A bactéria foi agindo conforme sua necessidade de

sobrevivência, ou seja, a amostra residual (D) de 0 há 72 horas forneceu nutrientes necessários para produção de etanol. Após esse tempo, houve um declínio na produção, onde o agente fermentativo consumiu os nutrientes do meio.

Um fator de relevância no processo fermentativo é a temperatura, segundo os autores Stupielo e Hiorii (1981), Nogueira e Venturini-Filho (2005) temperaturas inferiores a 30-32°C prolongam o tempo de fermentação, levando a redução significativa da atividade fisiológica das leveduras. Sendo assim, a temperatura de 36°C em que ocorreu o processo de fermentação com *E. coli* está acima da temperatura citada pelos autores, podendo haver relação no declínio do processo após 72 horas.

O declínio também pode estar relacionado a presença de ésteres oriundos de produtos secundários do processo fermentativo. Ingledew (1999) menciona que o ácido succínico é o principal produto secundário entre os ácidos orgânicos, mas também é produzido em quantidade menores de ácido pirúvico, málico, fumárico, oxaloacético, cítrico,  $\alpha$ -cetoglutárico, glutâmico, propiônico, láctico e acético, onde alguns destes ácidos orgânicos são acumulados devido à atuação de enzimas pela limitação do ciclo do ácido cítrico, onde muitos destes ácidos podem intervir no produto final e podendo ainda ser convertidos em ésteres.

#### 11.4. Comparação dos métodos de fermentação

Na tabela 5 estão os resultados do teor de álcool com concentração de 10% de *Escherichia coli* ao longo do tempo de 72 horas das amostras de álcool (A, B, C e D) e o Álcool do mel comercial utilizando as três rotas de fermentação.

**Tabela 5** – Teor de álcool das amostras de mel (A, B, C e D), obtidas em fermentação de 10% de concentração de *E. coli* no tempo de 72 horas de acordo com os métodos aplicados: (1) [erlenmeyer](#) em estufa; (2) kitassatos interligados em estufa e (3) [erlenmeyer](#) em câmara de anaerobiose.

Amostras	Métodos/ °GL (%)		
	(1)	(2)	(3)
<b>Amostra A</b>	32,0 ± 0,4	9,0 ± 0,1	88,0 ± 0,5
<b>Amostra B</b>	28,0 ± 0,7	2,0 ± 0,1	86,0 ± 0,2
<b>Amostra C</b>	49,0 ± 0,5	5,0 ± 0,2	85,0 ± 1,0
<b>Amostra D</b>	73,0 ± 0,06	2,0 ± 0,1	82,0 ± 0,3
<b>Mel Comercial</b>	55,0 ± 0,5	1,0 ± 0,1	86,0 ± 0,1

---

Analisando a Tabela 5 é possível observar que as porcentagens de álcool nas amostras variam de acordo com o método empregado.

O método (1) utilizando o erlenmeyer para acondicionar as amostras em estufa, e mantido na temperatura de 36°C, foi o primeiro a ser empregado no processo fermentativo. Como já mencionado anteriormente o resultado da amostra (D), volta a se destacar, não só neste método como também no método (3) em câmara de anaerobiose. Isso deve-se não só pelos componentes residuais da amostra, mas sim pela otimização do meio para o processo fermentativo.

O maior rendimento do método (3), se explica ao fato da bactéria ser somente capaz de crescer na ausência de oxigênio, pois nos métodos (1 e 2) mesmo com a vedação dos excipientes que mantinham a fermentação, não impediu por completo a passagem do oxigênio para dentro do preparado, evidenciando que o oxigênio atrapalhou o desempenho da *E. coli*, e conseqüentemente o seu rendimento.

Também houve interferência pela presença de microrganismos contaminantes que afetam de forma direta o processo fermentativo. Cabrini e Gallo (1999), afirmam que os microrganismos contaminantes que se destacam são fungos, bactérias e leveduras.

No processo fermentativo do preparado do método (2), houve crescimento de fungos, e estão diretamente relacionados ao baixo rendimento de álcool deste método, quando comparado ao método (1), já que esse método também foi empregado à estufa. Os fungos e bolores são fonte de contaminação secundária fáceis de controlar, mas caso não ocorra uma correta higienização e boas práticas, podem intervir nas boas práticas de fabricação. Finola, Lasagno e Marioli (2007) afirmam que normalmente os bolores encontrados no mel são do gênero *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*, onde sobrevivem, mas não se reproduzem no mel, o que leva a presença de leveduras de estirpes de *Bettsya alvei*, *Acosphaera apis* e *Acosphaera major*, que indicam recente contaminação pelo ambiente de recolha da abelha, colmeia ou equipamento de processamento. Snowdon e Cliver (1996) afirmam que as principais leveduras encontradas no mel são do gênero *Sacchromyces*, mas já foram encontrados *Debaromyces*, *Hansenula*, *Limpomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Zygasacchamyses*. Sendo assim, podendo relacionar a presença destes microrganismos contaminantes no processo de produção de álcool do método (2).

A ausência do oxigênio ou presença do mesmo no processo fermentativo, cooperou para o mecanismo de respiração celular, importante para a obtenção de energia em condições



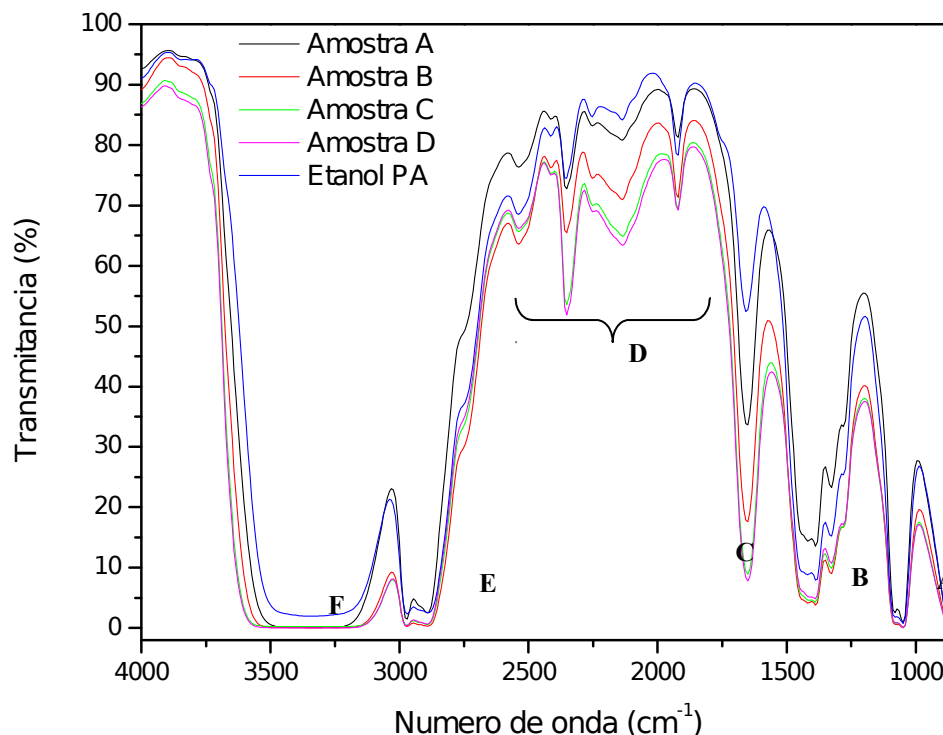
anaeróbicas ou semi anaeróbicas para a *Escherichia coli*, assim como ocorre com as leveduras. Segundo Crabtree (1928), as leveduras são capazes de crescer na presença ou ausência de oxigênio, ou seja, são anaeróbios facultativos. Quando o oxigênio do meio é suficiente e o substrato é baixo, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a respiração aeróbia (fosforilação oxidativa) onde o oxigênio fica como acceptor final de elétrons. Os açúcares são utilizados para que haja produção de energia no crescimento celular, mas quando o oxigênio se ausenta, anaerobiose, com alta concentração de glicose, o principal produto final é o etanol. Sendo assim a *Saccharomyces cerevisiae* pode alternar a respiração para a fermentação alcoólica, onde em condições anaeróbicas é o único modo de produzir energia.

No entanto a fermentação alcoólica pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio, conforme o estudo denominado efeito Crabtree (CABTREE, 1928), vai depender do microrganismo, quando a concentração de glicose ultrapassa um valor crítico, ocasionado pela inibição da síntese de enzimas respiratórias (VAN DIJKEN e SCHEFFERS,1986). Deste modo em condições anaeróbicas ou em elevada concentração de glicose, o piruvato é reduzido a etanol havendo a liberação de dióxido de carbono.

Essas rotas fermentativas foram utilizadas pela bactéria nos três métodos ((1), (2) e (3)) empregados, pois houve a produção de etanol como produto final, mesmo que as porcentagens de teor alcoólico se apresentem diferentes. Mas fica evidente que o método em destaque é o (3), pois de mostrou-se muito eficiente na retirada de  $O_2$ , o que favoreceu na produção de álcool, já que a *E. coli* é uma bactéria fermentativa de meio anaeróbico, a ausência do oxigênio e alta concentração de glicose fez com que a o produto final da rota fosse o etanol, sendo assim, o método mais eficiente.

### **11.5. Caracterização do álcool por espectroscopia no infravermelho**

A Figura 9, mostra os espectros dos álcoois obtidos no processo fermentativo, pelo método com erlenmeyer em câmara de anaerobiose, das amostras residuais, sendo comparados ao espectro do Etanol PA.



**FIGURA 9.** Espectros FTIR das amostras de álcool (A, B, C e D) comparada ao espectro de etanol PA.

A análise por FTIR (dados de intensidade, formato e posição de bandas) das amostras, (Figura 11) revela bandas de absorção em regiões de interesse, como também citados por Silverstein e Webster (2000). A presença de compostos orgânicos estão listados na Tabela 6 abaixo.

**TABELA 6.** Características das bandas obtidas.

Região	Número de Onda	Características
<b>A</b>	1000 – 1260 $\text{cm}^{-1}$	C – O Alcoois primários
<b>B</b>	1330 – 1420 $\text{cm}^{-1}$	O – H Deformação angular
<b>C</b>	1650 – 1700 $\text{cm}^{-1}$	C – C Deformação axial do anel
<b>D</b>	1750 – 2700 $\text{cm}^{-1}$	Frequência de combinação
<b>E</b>	2850 – 2990 $\text{cm}^{-1}$	C – H Deformação axial
<b>F</b>	3200 – 3450 $\text{cm}^{-1}$	O – H Ligação H intermolecular

A identificação destes compostos orgânicos permite evidenciar espectros similares ao espectro do etanol PA, reafirmando que o método empregado em câmara de anaerobiose foi o mais eficiente em termos de produção de álcool de qualidade.

## 12. CONCLUSÕES

Para esse trabalho foram testados métodos semi anaeróbicos e aeróbico para a produção de álcool por fermentação com *Escherichia coli* a partir de quatro amostras de resíduos de mel silvestre em diferentes períodos de armazenamento, da região Centro Sul do Paraná da cidade de Prudentópolis.

Os parâmetros físico-químicos analisados, sugerem que os resíduos de mel silvestre não correspondem aos valores de referência encontrados na literatura para méis comerciais, resultados já esperados por se tratar de mel oxidado e com a qualidade comprometida.

A produção de álcool com resíduo de mel apresenta vários problemas, a maior parte destes, estão relacionados às seguintes condições: elevada concentração de açúcar, valor de pH básico, metabolitos produzidos pela microbiota normal e outros microrganismos contaminantes. A fermentação em câmara de anaerobiose com erlenmeyer foi o método que apresentou melhores resultados em teor de álcool.

Para a fermentação, o primeiro método aplicado foi o sistema semi anaeróbico com erlenmeyer, avaliando a produção de álcool ao longo do tempo de 0 a 72 horas de fermentação com 10% V/V de *E. coli*, onde todas as amostras residuais obtiveram resultado positivo para produção de álcool, em que se destaca a amostra residual (D) com acentuada concentração de frutose, componente assimilado quantitativamente pela bactéria ao longo do tempo de fermentação.

Em decorrência do resultado apresentado pela amostra (D), foi empregado a ela o mesmo método, porem analisado ao longo do tempo de 0 a 120 horas. Ao comparar os tempos de fermentação empregados para este método, a amostra (D) de 0 a 72 horas forneceu nutrientes necessários para a produção de álcool. Após este tempo houve um declínio na produção, onde o agente fermentativo consumiu os nutrientes do meio. O declínio que ocorreu até as 120 horas está relacionado com a presença de metabolitos secundários do processo fermentativo da amostra e também à temperatura do processo.

Na caracterização do álcool por espectroscopia no infravermelho foi possível identificar os compostos orgânicos e evidenciar espectros similares ao etanol PA, reafirmando que o método empregado em sistema de câmara de anaerobiose com erlenmeyer foi o mais eficiente em termos de produção e qualidade. Os espectros apresentaram semelhanças entre si.

### 13. REFERÊNCIAS

- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Resaearch**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ALMEIDA, J. R. M. Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel. **Circular Técnica 07, Embrapa**, 2011.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 3, p. 15-23, 2010.
- ALVES, D. F. S.; JÚNIOR, F. C. C.; CABRAL, P. P. A. C.; JUNIOR, R. M. O.; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, A. C. Efeitos da aplicação tópica do mel melípona subnitida em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008.
- AMENDOLA, G. F.; ILHA, M.; BERGER, R.; STEDILE, R.; SCHOISSLER, J. E. Correção de defeito ósseo femural em cães utilizando implante cortical homólogo conservado em mel. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 302-307, 2003.
- AMORIM, H. V. de; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **STAB Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v. 5, p. 12-18, 1982.
- ANGELIS, D. F de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana- Produção e qualidade**. Jaboticabal, FUNEP, 1992 p. 49-66.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origino f honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.
- ACQUARONE, C.; BUERA, P.; ELIZALDE, B. Patterno f pH and electrical conductivity upon honey diluition as a complementary tool for discriminating geographical origin of discriminating geographical origin of honeys. **Food Chemistry**, v. 101, p. 695-703, 2007.
- ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUZA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2006.
- AROUCHA, E. M. M.; OLIVEIRA, A. J. F; NUNES, G. H. S.; MARACAJÁ, P. B.; SANTOS, M. C. A. Qualidade do mel de abelha produzido pelos incubados da IAGRAM e comercializado no município de Mossoró/RN. **Caatinga**, v. 21, n. 1, p. 211-217, 2008.
- ARRÁEZ-ROMÁN, D., GÓMEZCARAVACA, A.M., GÓMEZ-ROMERO, M., SEGURA-CARRATERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification of phenolic compounds in

- Rosemary honey using solid-phase extraction by capillary eletrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1648-1656, 2006.
- ASHIKARI, T., NAKAMURA, N., TANAKA, Y., KIUCHI, N., SHIBANO, Y., TANAKA, T., AMACHI, T. e YOSHIKAZUMI, H. Rhizopus raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.50, n.4, p.957-964. 1986.
- AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; SOUZA, S. R.; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v. 80, p. 249-254, 2003.
- BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 89 – 105, 2008.
- BALTRUSAITYTE, V.; VENSKUTOINS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, p. 502-514, 2007.
- BANDO, E.; GONÇALES, L. N.; TAMURA, N. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana ás micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2007.
- BARHATE, R. S.; SUBRAMANIAN, R.; NANDINI, K. E.; HEBBER, H. U. Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. **J. Food Eng.**, v. 60, n. 1, p. 1-6, 2003.
- BARTH, M. O.; MAIORINO, C.; BENATTI, A. P. T.; BASTOS, D. H. M. Determinação de Parâmetros Físico-químicos e da Origem Botânica de Méis Indicados Monoflorais do Sudeste do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.2, p. 229-233, 2005.
- BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M. S.; MARIOLI, J. M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 375-381, 2007.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidante activity and colour of slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822-828, 2007.
- BEVAN, D., BOND, J. Microorganism in field and mill – a preliminary survey. In: CONFERENCE OF SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 38., 1971. **Proceedings...**

p. 137-143.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. **Apidologie**, v. 28, p. 1-59, 1997.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

BRASIL. Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro, **Diário da República** 1ª Série A.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº6, de 25 de julho de 1985. Normas Higiênico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados. **Diário Oficial da União**, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Revoga a Portaria nº367 de 04/09/1997. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p. 23, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, de 18 de setembro de 2003, Seção 1, p. 14, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA nº 12 de 30 de março de 1978. Aprova as seguintes Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos e bebidas, para efeito em todo território brasileiro. **Diário Oficial da União**, Seção 1, de 24 de julho de 1978, p. 11499, 1978.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 367, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, de 08 de setembro de 1997, Seção 1, p. 19697, 1997.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, de 10 de janeiro de 2001, Seção 1, p. 45, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise Epidemiológica dos surtos de doenças de transmissão por alimentos no Brasil, 1999 – 2009**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf)>

Acesso em: 20/10/2015.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação

alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 207-215, 1999.

CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex standard for honey**. Codex Stan 12-1981, 2. Revisions 1987 and 2001, p. 1-8. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta=310](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310)>. Acesso em: 15/12/2015

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, T. J. P. S.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 23, v. 1, p. 1-5, 2003.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.

CARDONA, C. A., SANCHEZ, Ó. J., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from diferentes feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270 – 5295. 2007.

CAMARGO, R. C. R.; LOPES, M. T. R.; PEREIRA, F. M.; VILELA, S. L. O. **Produção de Mel**. Net. Piauí: julho de 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm>>. Acesso em: 14/05/2015.

CASTRO-VASQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; PÉREZ-COELHO, M. S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, v. 112, p. 1022-1030, 2009.

CHENG, M.-C., CHANG, R.-C., DENT, D.-F. e HSIEH, P.-C. Breeding an Amylolytic Yeast Strain for Alcoholic Beverage Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, n.6, p.693-706. 2011.

CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo: Nobel, 1993.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Action Antibacterienne des Miels d'abilles Africanisés Apis mellifera at de Méliponinés Du Brésil. **Apidologie**, v.22, p. 61-73, 1991.

CHERUBIN, R. A. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Compostos voláteis em méis florais **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 90-96, 2003.

DERRINGER, G., SUICH, R., Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214 – 219, 1980.

- DORNELLES, A. S.; RODRIGUES, S. **Fermentação Alcoólica de Caldo de Cana utilizando grãos de Kefir**. *Ciência Agrônômica*, v. 37, n. 3, p. 386-390, 2006.
- CHEUNG, T. L.; GERBER, R. M. Consumo de mel de abelhas: análise dos comportamentos de comensais do Estado de Santa Catarina. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 10, p. 22-31, 2009.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. High level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.
- DANTAS, P. C.; CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; GONÇALVES, F. B.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Preferências da população da região metropolitana da grande Aracaju (SE), sobre o consumo de produtos apícolas. **Scientia Plena**, v. 5, n. 12, p. 1-7, 2009.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.
- DE RODRÍGUEZ, G.O.; FERRER, B. S.; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v. 84, p. 499-502, 2004.
- DOWNEY, G.; HUSSEY, K.; KELLY, J. D.; WALSH, T. F.; MARTIN, P. G. Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. **Food Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 347-354, 2005.
- ESCRICHE, I.; VISQUERT, M.; JUAN-BORRÁS, M.; FITO, P. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. **Food Chemistry**, v. 112, p. 329-338, 2009.
- ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A. P.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3774-3779, 2008.
- ESTRADA, H.; GAMBOA, M. M.; CHAVES, C.; ARAIS, M. L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus Niger*: evaluación de su carga microbiológica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 55, n. 2, p. 167-171, 2005.
- FERREIRA, L. G. R.; ALBUQUERQUE, I. M. Alterações nos níveis de prolina nas folhas e partes florais de caupi (*vigna unguiculata* (L.) walp) induzidas por variações de temperatura. **Ver. Bras. Fisiol. Vegetal**, v. 2, n. 1, p. 71-76, 1990.
- FIDLER, S.; DENNIS, D. Polyhydroxyalcanoate production in recombinant *Escherichia coli*.



**FEMS Microbiol**, v. 103, p. 231-236, 1992.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1649-1653, 2007.

FITE, A.; TADESSE, A.; URGA, K.; SEYOUM, E. Methanol, fusel oil and ethanol contents of some Ethiopian traditional alcoholic beverages. **Ethiopian Journal of Science**, v.14, p.19-27, 1991.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 35-37, jul./ago. 1991.

GHELDOLF, N.; WANG, X. H.; ENGESETH, N. J. J. Identification and Quantification of heme iron analysis in raw and cooked red meat. **Food Chemistry**, v. 50, p. 5870-5877, 2002.

GLEITER, R. A.; HORN, H.; ISENGARD, H. -D. Influence of type and stete of crystallization on the water activity of honey. **Food Chemistry**, v. 96, p. 441-445, 2006.

GUEZ, M. A. U.; ALVES, A. R. C.; RAMOS, B. F. M; MACHADO, B. A. S. Estudo Prospectivo de produtos derivados do Mel associado ao Álcool e Tecnologias correlatas sob o enfoque em Documentos de Patentes. **Cadernos de Prospecção - ISSN 1983-1358 (print) 2317-0026 (online)**, 2013, vol.6, n.2, p.115-124. D.O.I.: <<http://dx.doi.org/10.9771/S.CPROSP.2013.002.014>>. Acesso: 25/07/2016.

HENRIQUES, A. **Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas?** Tipo: revisão. Schol of Applied Sciences; University of Wales Institute; Wales, Cardiff, UK, 2004. Disponível em: <<http://www.Forma-te.com/Mediateca>>. Acesso em: 16/05/2015.

HOSNY, L. M.; EL-GHANI, S. A.; NADIR, A. R. Nutrient composition and microbiological quality of three unifloral with emphasis on processing of honey probiotic youghurt. **Global Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2009.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press, 1999. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer.

IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **International Jouarnal of Food Microbiology**, v. 105, p. 297-304, 2005.

ISENBERG, H. D. & D'AMATO, R. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLEN, M.A.; TENOER, F.C.; YOLKEN, R.H.

- Manual of clinical microbiology.** Washington, D.C.: ASM Press, p.5-18, 1995.
- JANZANTTI, N. S. **Compostos Voláteis e qualidade de sabor de cachaça.** Campinas, 2004. P 124. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** ed. 6. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JUSTINO, M.; MUTTON, R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: FILHO, W. G. V. Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado, São Paulo: **Editora Edgard Blucher**, p. 485-522, 2005.
- KETCHUM, P. A. **Microbiology: concepts and applications.** New York: John Willey & Sons, 1988.
- KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis melífera L.*, 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2002.
- KÜÇÜK, M.; KOLAIH, S.; KARAOGLU, S.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAM, F. Biological activities and chemical composition of three honey of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526-534, 2007.
- KUMAR, A.; KAUSHIK, R.; KASHYAP, A.; KASHYAP, M.K. Indian honey: a natural product with antibacterial activity against antibiotic resistant pathogens, na “in vitro” study. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 190-193, 2005.
- LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; BACANDRITSOS, N.; SABATINI, A. G. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 9-21, 2004.
- LEE, S. Y. *E. coli* moves into the plastic age. **Nature Biotechnol**, v. 15, p. 17-18, 1997.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Principios de Bioquímica. 2º ed. São Paulo: Sarvier, 2000.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial.** São Paulo: Edgar Blücher, v. 3, cap. 1, p. 1-43, 2001.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, p. 627-642, 2006.
- LOPES, A. C. Produção de Álcool de Batata-doce em função do meio fermentativo. Guarapuava, 2013. Dissertação (Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis) - Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, Parana.

- LÓPEZ, A. C., ALIPPI, A. M. Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 212-219, 2009.
- LUSBY, P. E.; COOMBERS, A. L.; WILKINSON, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 464-467, 2005.
- MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. Tecnologia da Cachaça de Alambique. Belo Horizonte: SEBRAE/MG, 2006.
- MAGALHÃES, E. O. Alternativa de Geração de Emprego e Renda. **MSc Ceplac/Cepec/Secen/Apicultura Apicultura – S.A**, 2002.
- MATTIETTO, R. A.; LIMA, F.; VENTURIERI, G. C.; ARAÚJO, A. A. de. Tecnologia para obtenção artesanal de hidromel do tipo doce. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado Técnico**, v. 170, p. 5, 2006.
- MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; ALMEIDA, S. M. DE ; LIMA, E. T. DE ; ANDREATTI FILHO, R. L. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação para soltura. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 185-189, 2010.
- MATSUDA, A. H.; SABATO, S. F. Effects of irradiation on Brazilian honey's consistency on their acceptability. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, n.1-2, p. 109-112, 2004.
- MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v. 73, p. 5-28, 1992.
- MORAES, L. M. P., ASTOLFI-FILHO, S. e OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express  $\alpha$ -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.43, n.6, p.1067-1076. 1995.
- MULU, A.; TESSEMA, B.; DERBIE, F. In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. **Ethiop. J. Health Dev.**, v. 82, n. 2, p. 107-112, 2004.
- MUTTON, M. J. R. Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) tratadas com maturadores químicos. p. 178, 1998. Tese (Livre Docência). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.
- MUNDO, M. A.; PADILHA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 1-8, 2004.
- NAVRÁTIL, M.; STURDÍK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 977-982, 2001.
- NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. Aguardente de Cana. Universidade

Estadual Paulista, Botucatu, p. 66, 2005.

NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; JIMÉNEZ J. J.; MARTÍN, M. T. Highperformance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. **Journal of Chromatographi A**, v. 917, n. 1-2, p. 95-103, 2001.

ODDO, L. P.; PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. **Apidologie**, v. 35, n. 1, p. 38-81, 2004.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey a reservoir for microorganisms and an inhibitory agente for microbes. **African Health Sciences**, v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. 1. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, A. P. R. **Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel**. Escola Superior Agrária de Bragança, Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar), 2008.

PIRES, R. M. C. Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí. 2011. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí.

PHILLIPS, K. M.; CARLSEN, M. H.; BLOMHOFF, R. Total antioxidante content of alternatives to refined sugar. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 64-71, 2009.

RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

RUSSEL, I., Understanding yeast fundamentals. In: **The Alcohol Textbook**. A reference for 70 the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press, 2003.

SANTANA, N. B., Eficiência de hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcóolica para produção de etanol. Dissertação de mestrado. UFV, 2007.

SANTOS, A. M.; SOUZA, C. C. A.; Aspectos da conversão de glicerol em etanol: análise bibliográfica. **8º ENEPE UFGD, 5º EPEX UEMS**, 2014.

SATO, T.; MIYATA, G. Nutrition. **New York**, n. 16, p. 468-469, 2000.

SERRA, M. C. C. As propriedades Antioxidantes do Mel. Centro de Estudos de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2007.

- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2007. **Informações de mercado sobre mel e outros derivados das abelhas: sumário executivo**, 2007. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/E41C0BA5033EB42D8325727D004FCE50/\\$File/NT00035056.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/E41C0BA5033EB42D8325727D004FCE50/$File/NT00035056.pdf)>. Acesso em: 10/07/2016.
- SHIGECHI, H., KOH, J., FUJITA, Y., MATSUMOTO, T., BITO, Y., UEDA, M., SATOH, E., FUKUDA, H. e KONDO, A. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and Î±-Amylase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.8, August 1, 2004, p.5037-5040. 2004.
- SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo. p. 229, 2000.
- SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2/3, p. 260-265, 2004.
- SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E. R.; CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xilose, glucose and sugarcane bagasse hidrolisate. **Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 245-254, 2004.
- SILVA, S. J. N.; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrônica capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 46-50, 2008.
- Silva, r. N.; monteiroi, v. N.; alcanforii, j. D. X.; assisiii, e. M.; e. R. Asquieri. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol. 23 n. 3, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M. WEBSTER, F.X. Identificação Espectométrica de Compostos Orgânicos. 6ª Ed., Rio de Janeiro: **LTC Livros Técnicos e Científicos**, 2000.
- SODRÉ, G. S., MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P.; CARVALHO, C. A. L. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1139-1144, 2007.
- SOLOMONS, G., Química Orgânica. Ed. McGraw-Hill, 1999.
- SOUZA, R. S.; CARNEIRO, J. G. M. Pesquisa de sujidades e matérias estranhas em mel de abelhas (*Apis mellifera* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 32-33, 2008.
- SBRT. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2010. **Aguardente de mel**. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 20/03/2016.

- SHEIKH, D.; ZAMAN, S. U.; NAQVI, S. B.; SHEIKH, M. R.; ALI, G. Studies on the antimicrobial activity of honey. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 51-62, 1995.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciencia & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.
- SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.
- SPENCER, G. L.; MEADE, G. P. Special Reagentes. Cane Sugar Handbook, New York, Wiley, 1945.
- SROKA, P.; TUSZYNSKI, T. Changes in organic acid content during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1250-1257, 2007.
- STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 17, p. 43-46, 1981.
- TAVARES, A. C. K.; ZANATTA, E.; ZAVAREZE, E. R.; HELBIZ, L. E.; DIAS, A. R. G. The effects of acid and oxidative modification on the expansion properties of rice flours with varying levels of amylase. **Food Science and Technology**, v.43, p. 1213-1219, 2010.
- TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International of Food Microbiology**, v. 69, p. 217-225, 2001.
- TERAMOTO, Y.; SATO, R.; UEDA, S. Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine, ogol. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 160-163, 2005.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanic origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 485-496, 2001.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. **Atheneu**, 5 ed, 2005.
- TRINDADE, J. L. F.; MEIRA, H. L.; BRASILEIRO, D. T.; OLIVEIRA, C. S.; GRDEN, L. **Mel como substituto da glucose de milho em sorvetes**. In: V SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Ponta Grossa, v. 02, n. 01, 21 a 25 de maio, 2007.
- VAN DIJKEN, J. P. e SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.32, n.3-4, p.199-224. 1986.
- VENTURA, R. Quantificação do ácido lático na fermentação etanólica como parâmetro de

monitoramento do processo. Rio Claro, agosto de 2007. Dissertação (Ciências Biológicas, área de concentração Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI M. F.; SILVA, L. C. Características do mel. Boletim Técnico – PIE-UFES:01107, 2007. Disponível em: <[http://www.agais.com/telomc/b01107\\_caracteristicas\\_mel.pdf](http://www.agais.com/telomc/b01107_caracteristicas_mel.pdf)>. Acesso em: 17/04/2016.

VOJINOVIC, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring – Part I: In situ sensors. **Sensors and Actuators B**, v. 114, p. 1083-1091, 2006.

ZHANG, X.; JANTAMA, K.; MOORE, J. C.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 355-366, 2007.

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, n. 71, p. 235-239, 2000.

WHITE JUNIOR, J. W. The composition of honey. **Bee World**, v. 38, n. 3, p. 57-66, 1957.

YEPES, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLANOS, G. 2002. Producing antioxidante fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194-197, p. 879-884, 2002.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica, STAB: **Áçucar, Álcool e Subprodutos**. Piracicaba, v. 9, n. 5, p. 38-39, 1991.

YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; INGRAM, L. O. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 132–138, 1998.

WHO. World Health Organization. (Environmental Health Criteria 11) **Mycotoxins**. Geneva: UNEP/WHO, p. 127, 1979.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. **Media Centre: Drug-resistant Salmonella**. WHO, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 27/10/2015

### Anexo A – Caracterização Físico-Química

<b>Amostra A</b>					
	<b>pH</b>	<b>AR</b>	<b>Brix</b>	<b>GL</b>	
1	6	81,9	77	18	
2	6	82,1	75	17	
3	6	81,7	79	17,5	
<b>Média</b>	6	81,9	77	17,5	
<b>Desvio Padrão</b>	0	0,2	2	0,5	
<b>Amostra B</b>					
	<b>pH</b>	<b>AR</b>	<b>Brix</b>	<b>GL</b>	
1	6	55,5	55,8	14	
2	6	53,3	55,7	14,8	
3	6	54,4	55,5	13	
<b>Média</b>	6	54,4	55,7	13,9	
<b>Desvio Padrão</b>	0	1,1	0,15	0,90	
<b>Amostra C</b>					
	<b>pH</b>	<b>AR</b>	<b>Brix</b>	<b>GL</b>	
1	6	42,6	70,8	17,3	
2	6	43,5	70,6	16,7	
3	6	44	70,4	17	
<b>Média</b>	6	43,4	70,6	17,0	
<b>Desvio Padrão</b>	0	0,71	0,2	0,3	
<b>Amostra D</b>					
	<b>pH</b>	<b>AR</b>	<b>Brix</b>	<b>GL</b>	
1	6	67,9	50,4	12	
2	6	66,7	52	12,3	
3	6	67	50	11,7	
<b>Média</b>	6	67,2	50,8	12	
<b>Desvio Padrão</b>	0	0,62	1,06	0,30	



### Anexo B – Comparação dos Métodos

<b>Amostra A</b>	1	2	3
1	32	9	88,5
2	32,4	9,1	88
3	31,6	8,9	87,5
<b>Média</b>	32	9	88
<b>Desvio Padrão</b>	0,4	0,1	0,5
<b>Amostra B</b>	1	2	3
1	28	2	86,2
2	27,3	2,1	86
3	28,7	1,9	85,8
<b>Média</b>	28	2	86
<b>Desvio Padrão</b>	0,7	0,1	0,2
<b>Amostra C</b>	1	2	3
1	49	4,8	86
2	48,5	5,2	85
3	49,5	5	84
<b>Média</b>	49	5	85
<b>Desvio Padrão</b>	0,5	0,2	1
<b>Amostra D</b>	1	2	3
1	73	2	82
2	73	2,1	82,3
3	73,1	1,9	81,7
<b>Média</b>	73,0	2,0	82,0
<b>Desvio Padrão</b>	0,06	0,10	0,30
<b>Amostra MEL</b>	1	2	3
1	55,5	1	86,1
2	54,5	1,1	86
3	55	0,9	85,9
<b>Média</b>	55	1	86
<b>Desvio Padrão</b>	0,5	0,1	0,1