

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO

MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DEQ

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO DIFERENTES  
TIPOS DE MÉIS E TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

JOÃO PAULO NIEMES

Guarapuava

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO

MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DEQ

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO DIFERENTES  
TIPOS DE MÉIS E TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

JOÃO PAULO NIEMES

Dissertação de mestrado apresentada à universidade Estadual do Centro-Oeste para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada. Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr.  
Marcos Roberto da Rosa  
Co-Orientadora: Profa. Dra.  
Maria de Lurdes Felsner

Guarapuava  
2013

## Ficha aprovação Pós-Graduação

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Lídia e Vicente, aos meus irmãos Lidiane e Sérgio, a todos meus amigos e professores, os quais sempre me apoiaram e contribuíram de uma forma ou de outra para a execução deste trabalho.

## Resumo

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e otimização de metodologias para a produção e caracterização de hidromel preparado por meio de diferentes tipos de mel e fermentação. Além disso, foram realizadas caracterizações de pH, acidez, umidade, °B, teor de cinzas e umidade, por termogravimetria, e teor de açúcares redutores totais dos méis utilizados, permitindo a comparação entre eles, analisando a influência da sua procedência geográfica.

Para os hidroméis preparados foram aplicados os mesmos testes anteriormente mencionados com exceção da termogravimetria e realizada a determinação da concentração de 5-HMF ao final das fermentações curtas e longas, obtendo-se os valores médios de  $0,210 \pm 0,041$  e  $0,839 \pm 0,198 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores mostram que a bebida está dentro dos padrões internacionais de qualidade para este indicador e observando-se que em tempos mais longos ocorre maior formação deste composto devido à maior exposição dos carboidratos ao meio propício à desidratação das hexoses.

O grau alcoólico obtido apresenta diferenças entre fermentações curtas e longas, pois nas últimas foi possível obter valores com média 10 °GL e para as primeiras, de 8,75 °GL. Isto mostra que quando se deseja alcançar teores de álcool maiores na bebida devem-se empregar fermentações em tempos mais longos.

A comparação entre as bebidas preparadas foi realizada por meio de análise sensorial, onde se determinou o perfil sensorial da amostra e sua aceitabilidade pelo consumidor. Para isto realizou-se o treinamento dos provadores, pois se trata de uma bebida ainda pouco conhecida pelo mercado consumidor brasileiro. Verificou-se uma maior aceitabilidade do hidromel preparado a partir de um mel considerado ruim para o consumo in natura, com uma bebida preparada a partir de um bom mel para consumo in natura ocupando o segundo lugar.

Os resultados experimentais obtidos foram tratados por meio de ANOVA de dois fatores a 95 % de confiança, para que fosse possível a comparação entre as diferentes bebidas preparadas. Verificou-se ser possível o preparo do hidromel a partir desta metodologia que, se realizada de forma adequada, preserva todas as propriedades benéficas do mel, o que não ocorre com os processos tradicionais. Esta é uma excelente opção para as regiões de proteção ambiental, pois as abelhas

ajudam na polinização das flores, e com isso se pode aplicar a apicultura nestas regiões. E como a produção de mel é realizada predominantemente pela agricultura familiar, a produção do hidromel pode levar a uma melhor distribuição de renda. Isso propiciaria a estas famílias permanecerem no campo, evitando o êxodo rural, por meio do incentivo à produção de mel pelo preparo em larga escala do hidromel, agregando valor a um produto ainda pouco consumido em nosso país.

## Abstract

This work presents the development and optimization of methodologies for the production and characterization of mead, produced from different kinds of honey and by means of different fermentation times. Besides that, characterizations of pH, acidity, humidity, °B, ashes and humidity contents, by means of thermogravimetric analysis, and total reducing sugars content of the employed kinds of honey were realized, allowing comparisons among them, ascertaining the influence of their geographic origin.

All, but the thermogravimetric analysis, of the aforementioned tests were also applied to the mead and the concentration of 5-HMF at the end of both short and long fermentation times was determined, with average values  $0,210 \pm 0,041$  and  $0,839 \pm 0,198 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. These values show that the beverage is within the international standards of quality regarding this parameter and show also that longer times lead to greater concentrations of this compound, due to the longer exposition of carbohydrates to a medium adequate to the dehydration of hexoses.

The alcohol content obtained shows variations among long and short fermentation times, since in the last ones average values of 10 °GL were obtained, versus 8,75 °GL for the first ones. This shows that if higher alcohol contents are sought, longer fermentation times should be employed.

The comparison among the prepared beverages was realized by means of sensory analysis, where the sensory profile of the samples and their acceptability to the consumer were assessed. The testers were previously trained, because it is still a not very well known beverage in the Brazilian consumer market. It was verified that the mead produced from a honey generally considered unsuitable for fresh consumption was the one most strongly appreciated by the testers, with a mead produced from a honey more suitable for fresh consumption coming in the second place.

The experimental results obtained were subject to two-way ANOVA, with 95% confidence rate, to allow the comparison among the different prepared beverages. It was verified that the production of mead employing the proposed methodology is possible, with the advantage that this process, if executed correctly, preserves all the beneficial properties of the honey, unlike the traditional methodology. This is an

excelling perspective for the regions of environmental protection, since bees intervene in the pollination of the flowers, and thus apiculture can be exerted in these areas. As honey production is mainly carried through by family farming, mead production may lead to better income distribution. This would allow to these families to remain in the countryside, avoiding rural exodus, for it stimulates the production of honey to supply the demand created by mead production and aggregates value to a product still barely consumed in our country.

## Lista de Figuras

Figura 1. Reação de decomposição da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio.....	23
Figura 2. Decomposição térmica da glicose em 5-HMF.....	23
Figura 3. Via glicolítica da <i>S. cerevisiae</i> (RETORRI, 2000. BISSON, 2001). .....	31
Figura 4. Méis utilizados na preparação dos hidroméis (A – mel multiflora - PR; B – mel multiflora - MT; C – mel maria mole - PR; D – mel multiflora - SC).....	42
Figura 7. Curva analítica para o 5-HMF em bebidas por HPLC-UV.....	54
Figura 8. Hidroméis empregados na análise sensorial.....	64

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Avanço na produção de mel nacional, e no estado do Paraná.....	25
Tabela 2. Principais cidades produtoras de mel no Brasil. ....	26
Tabela 3. Valores das análises físico-químicas dos diferentes tipos de mel. ....	44
Tabela 4. Resultados das análises termogravimétricas diferenciais para os diferentes tipos de méis. ....	45
Tabela 5. Concentração de carboidratos contidos nos diferentes tipos de mel, determinados por CLAE-IR ( $\text{mg.g}^{-1}$ ). ....	47
Tabela 6. Valores da análise físico-química de pH, para os mostos preparados por diferentes tipos de méis.....	49
Tabela 7. Valores da análise físico-química de acidez livre ( $\text{meq.L}^{-1}$ ), para os mostos obtidos a partir de diferentes tipos de méis e fermentações. ....	50
Tabela 8. Valores de pH, para os fermentados obtidos por diferentes tipos de méis e fermentações.....	51
Tabela 9. Valores de acidez livre ( $\text{meq.L}^{-1}$ ), para os fermentados obtidos a partir de diferentes tipos de méis e fermentações. ....	51
Tabela 10. Valores obtidos pelas equações 5 e 6 para os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para as análises de HPLC-IR/UV.....	55
Tabela 11. Valores médios das concentrações dos açúcares ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) determinados por CLAE-IR, para os fermentados obtidos por tempos curtos de fermentação e temperatura ao ambiente.....	56
Tabela 12. Valores médios das concentrações dos açúcares ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) determinados por CLAE-IR, para os fermentados obtidos por tempos longos de fermentação e temperatura ao ambiente. ....	57
Tabela 13. Valores médios de grau alcoólico dos fermentados obtidos por tempos de fermentação curtos e com controle de temperatura e longos a temperatura ambiente. ....	58
Tabela 14. Valores médios das concentrações de 5-HMF ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) determinados por CLAE-UV para os fermentados obtidos por tempos de fermentação curtos e com controle de temperatura e longos a temperatura ambiente. ....	59
Tabela 15. Codificação das amostras empregadas na análise sensorial. ....	60

Tabela 16. Médias das notas atribuídas no teste sensorial de perfil de atributos dos hidroméis elaborados. ....	61
Tabela 17. Resultados do teste ADQ para aroma das bebidas.....	62
Tabela 18. Resultados do teste ADQ para sabor das bebidas.....	63
Tabela 19. Resultados do teste ADQ para aparência das bebidas. ....	64
Tabela 20. Resultados da análise sensorial para o teste de preferência. ....	65

## Lista de Siglas e Abreviaturas

TM	Tipo de Mel
TF	Tipo de Fermentação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
°B	Grau Brix
°GL	Gay-Lussac
IR	Índice de Refração
UV	Ultra Violeta
ANOVA	Análise de Variância
5-HMF	5-hidroxi-2-metil-furfural
a.C.	Antes de Cristo
L.D	Limite de Detecção
L.Q.	Limite de Quantificação
ADQ	Análise Descritiva Quantitativa
TG	Termogravimetria
DTG	Termogravimetria Diferencial
DTA	Análise Termogravimetria Diferencial
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato

## Sumário

Resumo .....	V
Abstract.....	VII
Lista de Figuras .....	IX
Lista de Tabelas .....	X
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	XII
1. Introdução.....	17
2. Revisão da literatura.....	19
2.1 História das bebidas fermentadas .....	19
2.2 Características e Benefícios do Mel .....	22
2.3 Hidromel, o Néctar dos Deuses.....	26
2.4 Fermentação Alcoólica .....	29
3. Materiais e Métodos .....	35
3.1 Materiais Utilizados .....	35
3.1.1 Mel.....	35
3.1.2 Levedura .....	35
3.2 Metodologia.....	36
3.2.1 Preparo do Hidromel .....	36
3.2.2 Análises.....	37
3.2.3 Determinação de Grau Alcoólico dos Hidroméis .....	38
3.2.4 Análise de Açúcares e 5-HMF por CLAE .....	38
3.2.5 Análise Sensorial dos Hidroméis.....	39
3.2.6 Análise Estatística dos Dados .....	40
4. Resultados e Discussão .....	42
4.1 Análises dos Méis.....	42

4.1.1	Análises Físico-Químicas .....	42
4.1.2	Análise Termogravimétrica (TG/DTG).....	45
4.1.3	Análises Cromatográficas dos Méis .....	46
4.2	Análises dos Mostos e Hidroméis.....	48
4.2.1	Análises Físico-Químicas dos Mostos.....	48
4.2.2	Análises Físico-Químicas dos Hidroméis .....	50
4.2.3	Análises Cromatográficas e Grau Alcoólico dos Hidroméis.....	52
4.3	Análise Sensorial.....	60
5.	Conclusão.....	66
6.	Referências.....	68
	Anexos.....	75
	Anexo A: Ficha ADQ.....	76
	Anexo B: Perguntas sobre consumo.....	79
	Anexo C: Teste de preferencia, perfil de atributos e teste de atitude. ....	80
	Anexo D: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). ....	81

## 1. Introdução

O hidromel é uma bebida preparada a partir do mel diluído em água e posteriormente fermentado. O álcool produzido é oriundo da conversão dos dois principais açúcares contidos no mel, a frutose e a glicose, tendo ainda constituintes minoritários como os flavonoides e polifenóis, além de minerais. Estes compostos irão exercer influência sobre o tipo de bebida preparada, uma vez que dependendo da região onde se é coletado o mel empregado no processo fermentativo se obterão características diferenciadas no hidromel.

A grande variedade de flora, fauna e clima no mundo propicia a obtenção de méis com características sensoriais, visuais e químicas particulares. Este fato é explicado pela composição do solo e das substâncias mandibulares que são introduzidas no néctar durante seu transporte e processo de maturação. Com isso o presente trabalho busca a aplicação de diversos tipos de mel oriundos de diferentes regiões do Brasil, pois assim é possível o preparo de hidroméis com características peculiares, gerando-se bebidas variadas, que podem apresentar colorações, aromas e teores de carboidratos residuais e de álcool variados.

Outro fator que tem influências sobre o hidromel é o tipo de fermentação empregado em seu preparo, uma vez que: em tempos mais curtos, temperatura e agitação controladas, o ciclo metabólico da levedura secreta menor quantidade de seus metabólitos. Já em tempos mais longos e a temperatura ambiente, o processo segue de maneira mais lenta sendo possível maior liberação de metabólitos por parte da levedura. Deste modo dependendo do tipo de mel e fermentação pode-se obter hidroméis com características diferenciadas e variações na qualidade do produto final.

Muitos dos processos atuais de preparo do hidromel passam pelo aquecimento do mel, o que não é aconselhado, pois nessas condições perde-se a qualidade do mel devido à presença de compostos voláteis como os polifenóis e flavonoides. Substâncias que atuam, por exemplo, na proteção dos glóbulos vermelhos e fortalecimento vascular, minimizando a ação dos radicais livres.

Em vista disso, este trabalho tem por objetivos a caracterização da matéria-prima e do hidromel desenvolvido. Para tanto foi realizado a otimização do processo de obtenção dos hidroméis, caracterização dos e méis oriundos de diferentes

regiões brasileiras e dos fermentados produzidos a partir destes e tipos de fermentação já mencionados anteriormente. Empregando técnicas de análise como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a termogravimetria diferencial (TG/DTG/DTA), análises de: pH, acidez e grau alcoólico, grau brix e índice de refração, e por fim avaliar as características sensoriais dos hidroméis por meio de análise sensorial, avaliando o tipo de fermentação, os diferentes méis, teores de açúcares e o efeito do envelhecimento em barril de Jequitibá.

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1 História das bebidas fermentadas**

Supõe-se que o primeiro contato do nosso antepassado primitivo, o proto-homem, com a bebida alcoólica foi ao ingerir uma fruta fermentada naturalmente, pelo ataque de leveduras selvagens no rompimento de sua casca, transformando a glicose em álcool etílico e gás carbônico. Desde então, essa transformação acompanha a evolução das civilizações, sendo fator determinante, muitas vezes, na identidade, simbolismo e até valorização da cultura de cada povo e localidade.

As bebidas fermentadas estão presentes no cotidiano do homem a milhares de anos, destacando-se entre elas a cerveja e o vinho. Segundo evidências arqueológicas a cerveja teria surgido a cerca de 10 milênios na Mesopotâmia, podendo ter sido fabricada a partir de cevada, mel, uvas ou tâmaras. Por volta de 6000 a.C. na Babilônia relata-se que a fabricação de cerveja já era realizada a partir de cevada maltada. No Egito era considerada uma bebida nacional de grande importância sendo produzida pelas sacerdotisas em rituais religiosos e logo em seguida distribuída ao povo (NIEMES, 2010).

Devido à natureza das matérias-primas empregadas relata-se que sua produção era feita pelos padeiros, que preparavam um tipo de bolo a partir dos grãos de cevada triturados, pré-assados e desmanchados em água para que as leveduras ambientes realizassem a fermentação. Este método rústico é atribuído aos egípcios e chamado de Bouza, sendo a partir deste momento que a fabricação e consumo da cerveja teria se difundido pela Europa e em seguida para o mundo (NIEMES, 2010).

No Brasil, a cerveja demorou a chegar, pois os portugueses temiam perder o filão da venda de seus vinhos. O hábito de beber cerveja começou nos tempos de D. João VI, época em que a Colônia Inglesa importava a bebida da Europa e, até o final do século passado, o Brasil ainda importava a bebida (ASSB, 2012).

As primeiras indústrias brasileiras surgiram na época da Proclamação da República, em 1889. Essas cervejas nacionais tinham um grau de fermentação tão alto que, mesmo depois de engarrafadas, produziam uma enorme quantidade de gás carbônico, criando grande pressão. As primeiras marcas nacionais foram a

Logos, Guarda Velha e Gabel. Um pouco mais tarde surgiram às marcas Vesosso, Stampa, Olinda, Leal e Rosa, todas de curta duração (ASSB, 2012).

Atualmente a cerveja é uma das bebidas mais consumidas no Brasil (61 % das doses ingeridas são de cerveja ou de chopp), seguido pelo vinho com 25 %, 12 % de destilados e 2 % de bebidas classificadas como “ice”. Segundo Yamamoto (2011) o Brasil produz anualmente cerca de 8,5 bilhões de litros de cerveja, apresentando consumo per capita de 47 L/ano (o que é considerado baixo para os padrões mundiais), ocupando o quinto lugar no ranking mundial de produção de cervejas. Tendo a China (27 bilhões de litros), os Estados Unidos (23 bilhões de litros), a Alemanha (10 bilhões de litros) e a Rússia com 9 bilhões de litros a sua frente, respectivamente.

O surgimento do vinho data do ano de 7000 a.C. sendo encontrados vestígios de sementes de uva em sítios arqueológicos na área que hoje corresponde à Turquia, Armênia e Geórgia. Segundo estudos realizados, é atribuída a essas regiões a primeira florada das videiras na era neolítica, a este período é atribuída ainda à transição de povos nômades a dos povos com locais de moradia definida onde surgiram as primeiras plantações, através das quais os povos começaram a realizar o plantio e colheita de seus alimentos (ESTREICHER, 2004. HISTÓRIA DAS BEBIDAS FERMENTADAS, 2012. JOHNSON, 1986).

A mais citada de todas as lendas sobre o surgimento do vinho é a versão persa que fala sobre Jamshid, um rei persa semi mitológico que segundo relatos está relacionado a Noé, pois teria construído um enorme muro para salvar animais do dilúvio. Na corte de Jamshid as uvas eram colhidas e guardadas em potes para que seu consumo fora de época pudesse ser realizado. Certa vez uma dessas jarras se apresentou cheia de suco e apresentando espuma característica do processo fermentativo, pois a uva naturalmente contém leveduras em sua casca, exalando ainda um odor diferente do costumeiro sendo consideradas essas uvas impróprias ao consumo e consideradas como veneno em potencial. Uma donzela do harém teria ingerido este veneno com intenções de tirar sua própria vida, contudo ao invés da morte esta encontrou alegria e sono repousante. Após o ocorrido esta narrou ao rei Jamshid que ordenou a produção de grande quantidade da nova bebida, e que esta fosse distribuída ao povo da corte (JOHNSON, 1986).

Atualmente o vinho no Brasil é consumido em ocasiões especiais, com média anual de 1,6 litros per capita, com produção anual de 2,5 bilhões de litros. Frente à produção e consumo mundial os valores observados são considerados muito tímidos, pois a produção mundial é de 294,6 bilhões de litros por ano, e em países como a França que responde por 19 % da produção mundial apresenta consumo per capita de 55 L/ano. Essa grande diferença pode estar associada especialmente a fatores relacionados à produção, já que a vinicultura depende de clima e solo específicos. No Brasil essas condições são encontradas apenas na região Sul do país, sendo o Rio Grande do Sul o Estado responsável por 95% da produção brasileira de vinhos. Além disso, devido ao custo de transporte ser alto, apenas a importação de vinhos mais caros é lucrativa (YAMAMOTO, 2011).

O vinho de arroz tradicional do Japão (saquê), conhecido como "a bebida dos deuses," tem uma história de mais de 2 mil anos mergulhada na tradição, inovação e personalização. O saquê é usado para muitas finalidades diferentes da religião xintoísta, como por exemplo, utilizado como oferenda aos deuses e para a purificação do santuário. No entanto o consumo de saquê japonês diminuiu desde o seu pico em 1974, que se assemelha a uma situação com consumo de vinho nos mercados tradicionais do vinho europeus, como a França, Itália, Espanha e Portugal e com o consumo de cerveja em mercados tradicionais europeus, como Bélgica, Alemanha ou Dinamarca (CHAMEEVA, 2010. MILLEN, 2012).

Historicamente, o saquê sempre foi produzido pelas famílias japonesas artesanalmente, em pequena escala. Eram mais de 20 mil produtores, os quais repassavam as técnicas de pai para filho. Isto tudo mudou quando o governo japonês, preocupado em regulamentar e profissionalizar a atividade proibiu a produção caseira e instituiu regras rígidas a fim de que só produtores profissionais fabricassem a bebida. Hoje eles são apenas 1,1 mil, e muitos deles se transformaram em gigantes do setor de bebidas mundiais, abrindo, inclusive, fábricas nos EUA (o maior consumidor mundial da bebida) para dar conta da demanda (MILLEN, 2012).

No Brasil, o saquê tem ganhado espaço, ao lado da cachaça e da vodca, como uma bebida utilizada na preparação de drinques como a caipirinha ou "saqueirinha", como também vem se tornando conhecida. Isto é devido à bebida ser mais fraca que os destilados citados e por apresentar sabor mais delicado, que

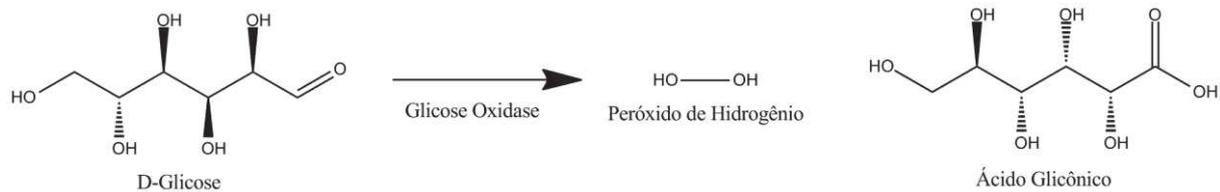
combina perfeitamente com frutas. Seu consumo apresenta um crescimento anual médio de 30 % (MILLEN, 2012).

## **2.2 Características e Benefícios do Mel**

Os produtos naturais sempre foram eleitos como opções interessantes para diversas funções cotidianas do homem, merecendo destaque o tratamento de doenças e a alimentação. Dentro deste contexto pode-se citar o mel, o qual desde os tempos pré-industriais é empregado na alimentação devido a sua vasta concentração de carboidratos (cerca de 80 % m/m). Os componentes principais são a frutose e a glicose (em média 38 e 30 % m/m, respectivamente) havendo também cerca de 1,3 % de sacarose e 27 oligossacarídeos que correspondem de 12 a 15 % (m/m) dos constituintes sacarínicos no mel, podendo-se destacar a maltose, isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos (MENDES, 2010. TURHAN, 2008. AL-MAMARY, 2002. NAGAI, 2006. NIEMES, 2010. OUCHEMOUKH, 2010. MATUTE, 2010).

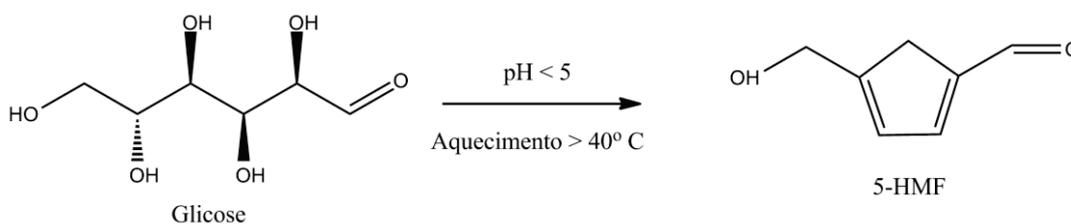
O mel contém ainda outras substâncias que são benéficas à saúde do homem, como compostos antioxidantes, anti radicalares, antialérgicos, antimicrobianos e substâncias com ação vasodilatadora. Estudos mais recentes apontam-no como um grande aliado no tratamento de desordens gástricas (TURHAN, 2008. IURLINDA, 2005. AL-MAMARY, 2002. ESTEVINHO, 2012. NAGAI, 2006. MENDES, 2010. NASUTI, 2006). Dentre os compostos responsáveis pelas ações citadas anteriormente se pode citar os flavonoides e ácidos fenólicos. Esta composição vasta do mel pode agir vascularmente de modo a proteger os glóbulos vermelhos da ação dos radicais livres (MARCHINI, 2005. EMATER, 2012).

O mel é constituído ainda por minerais (a coloração do mel será proporcional à concentração de minerais, ou seja, se a concentração é elevada a cor do mel será próximo do amarelo âmbar, enquanto que se for baixa poderá se encontrar incolor) (RODRIGUES, 2008), peróxido de hidrogênio e ácido glicônico os quais são produtos da decomposição enzimática de glicose por meio da glicose oxidase (Figura 1) (LOPES, 2011).



**Figura 1. Reação de decomposição da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio.**

O ácido glicônico e peróxido de hidrogênio exercem um papel importante na conservação e assepsia do mel, por meio da redução do pH, que se situa na faixa de 3,2 a 4,5, não permitindo que leveduras indesejáveis se desenvolvam e causem a deterioração do mel. Contudo podem agir neste tipo de matriz leveduras xerotolerantes que causam o aumento de acidez do mel. Isto geralmente ocorre por manejo e processamentos incorretos do mel. São vários os cuidados com o manejo de méis para que se possam conservar suas propriedades, podendo-se destacar o aquecimento como um dos principais fatores que afetam negativamente sua qualidade, pois se este for realizado acima dos 40°C se favorece a reação de desidratação da glicose, que é abundante no mel, convertendo-a em 5-hidroxi-2-metil-furfural (5-HMF) (Figura 2), reação que é favorecida em pH menor que cinco, ou por meio da reação de Maillard que irá afetar também a coloração do mel por meio de seu escurecimento (MENDES, 2010. TURHAN, 2008. NASUTI, 2006).



**Figura 2. Decomposição térmica da glicose em 5-HMF.**

A concentração de 5-HMF em méis é utilizada como padrão de qualidade, pois se encontradas concentrações muito altas (limite de 40mg.kg<sup>-1</sup>) indica problemas em sua manufatura, estocagem ou não se trata de um mel fresco. Para que um mel seja considerado de alta qualidade em relação a este parâmetro, a concentração do 5-HMF deve estar abaixo de 15 mg.kg<sup>-1</sup> de mel. O aquecimento irá ainda afetar a composição de flavonoides, polifenóis e ácidos orgânicos, pois estas substâncias são voláteis e em temperaturas acima dos 40°C sofrem decomposição

térmica, com isso o mel perde as suas propriedades farmacológicas amplamente conhecidas e estudadas (MENDES, 2010. TURHAN, 2008. NASUTI, 2006).

No mel existem ainda componentes minoritários, como outros ácidos orgânicos além do ácido glicônico, com destaque para os ácidos: fórmico, acético, benzóico, butírico, láctico, oxálico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, fenilacético, tartárico, maleico, piroglutâmico e valérico. Há também derivados de compostos fenólicos que podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides livres. A proporção desses três grupos varia de acordo com a origem floral dos méis (LIANDA, 2009).

Outro constituinte importante do mel é a água, que juntamente da frutose (devido a ser uma substância higroscópica), determinará se o mel irá ou não cristalizar. Outro fato a ser levado em consideração no mel é o efeito tampão que se pode observar devido ao baixo percentual de água (cerca de 20%), pois como mencionado anteriormente o mel possui ácidos pouco ionizáveis e minerais que propiciam a formação do equilíbrio químico da espécie molecular com seu sal correspondente. Um exemplo disso é a formação do acetato de sódio, o qual é formado pela presença de ácido acético e íons sódio no mel. A presença dessas espécies irá causar o tamponamento do mel e, devido a estes motivos, o pH do mel não sofre grandes variações ficando na faixa de 3,2 a 4,5. Outro fator associado ao percentual de água contido em méis é o desfavorecimento da ação de bactérias selvagens, que aliado ao pH e acidez atuam na conservação do mesmo.

Dependendo da flora e clima do lugar onde se coletam os méis pode-se obter características tanto de composição química, física e sensorial diferenciadas. Dentro deste contexto pode-se citar o mel de laranjeira, lavanda e os multiflorais, pois dependendo da região onde se cultivam determinadas espécies de plantas ou da presença de mata nativa que apresenta uma composição variada, as abelhas coletam os néctares específicos gerando méis com características regionais.

A maior parte dos méis obtidos atualmente ao redor do globo é produzida pelas abelhas do gênero *Apis mellifera* (Europa, África e Oriente Médio), *Apis cerana* (abelha de colmeia, nativa do sul da Ásia), *Apis dorsata* e *florea* (abelha que produz um único favo ao ar livre, nativas dos trópicos da Ásia). Mas há outras espécies que produzem diferentes tipos de mel, como as abelhas sem ferrão conhecidas por

meliponídeos, comumente encontradas nos trópicos dos continentes. Ao todo, conhecem-se atualmente cerca de 500 espécies de abelhas (NIEMES, 2010).

O fato de o Brasil ser um país de clima tropical favorece a produção de mel, pois as abelhas europeias são sensíveis ao frio, e a flora vasta fornece a possibilidade de se encontrar méis com características químicas, físicas e sensoriais distintas e boa qualidade. Com os avanços tecnológicos e a necessidade de preservação ambiental, a apicultura se torna uma opção viável, e com a abertura do mercado europeu se abriam portas para a exportação da produção de mel nacional, que vem crescendo nos últimos anos (Tabela 1).

A China figura em primeiro lugar na produção de mel mundial com cerca de 367 mil toneladas/ano, seguida pela Turquia com 82 mil toneladas/ano e pela Argentina com 81 mil toneladas/ano. O Brasil aparece em nono lugar respondendo por cerca de 38 mil toneladas/ano, o que pode ser melhorado tendo em vista a flora e espaço geográfico disponível para a prática da apicultura (GUERRA, 2011).

**Tabela 1. Avanço na produção de mel nacional, e no estado do Paraná.**

<b>Ano</b>	<b>Brasil (t)</b>	<b>Paraná (t)</b>	<b>Ranking (º)</b>	<b>Participação (%)</b>
2010	38.017	5.468	2	14,4
2009	37.765	4.831	2	12,5
2008	37.792	4.635	2	12,3
2007	34.747	4.632	2	13,3
2006	36.194	4.612	2	12,7
2005	33.750	4.462	3	13,2

Fonte: IBGE - Pesquisa Pecuária Municipal (SILVA,2010).

A produção de mel sofre algumas oscilações normais ao longo dos anos como pode ser observado nos dados apresentados pela Tabela 1. A explicação para este fato está no clima, pois em determinadas estações o excesso de chuva irá afetar diretamente a produção de mel por promover a retirada do néctar das flores (PARANÁ, 2012).

Com o crescimento observado nos últimos anos da produção de mel nacional (tabela 1), a região sul acompanhou esta evolução, figurando em primeiro lugar no ranking, respondendo por 42,57 % da produção nacional. O estado do Paraná destaca-se em segundo lugar neste ranking, respondendo por 14,4 % da produção, perdendo apenas para o estado do Rio Grande do Sul que apresenta produção de mel de 7.098 toneladas no ano de 2010 (SILVA, 2010). Segundo Guerra(2011) as cidades com maior produção de mel nacional de abelha estão listadas na tabela 2, merecendo destaque a cidade de Prudentópolis – PR, que nos dias atuais é conhecida como “Capital do Mel” (NIEMES, 2010).

**Tabela 2. Principais cidades produtoras de mel no Brasil.**

<b>Estado</b>	<b>Município</b>	<b>Produção (t)</b>
Ceará	Limoeiro do Norte	600
Pernambuco	Araripina	580
Rio Grande do Norte	Apodi	506
Santa Catarina	Içara	440
Santa Catarina	Bom Retiro	430
Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	276
Paraná	Prudentópolis	265

Fonte: IBGE, 2009 – Elaboração: Sebrae/PE, 2011.

O mel além de ser consumido *in natura* pode ser utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de outros produtos como cremes, shampoos, balas e *sprays* a base de mel e própolis, cervejas de malte com adição de mel, hidromel (NIEMES, 2010. CHAGAS, 2008).

### **2.3 Hidromel, o Néctar dos Deuses**

Um produto pouco conhecido que pode ser obtido a partir do mel diluído em água e posterior fermentação é o hidromel. Esta é considerada uma bebida tradicional e conhecida a milhares de anos, cuja produção moderna data de 2 milênios a.C. e tendo sua origem remetida ao continente africano (MENDES, 2010. PEREIRA, 2009. PEREIRA, 2012. SROKA, 2007. RIVALDI, 2009).

Segundo BULFINCH (2002) o hidromel era consumido pelos deuses nórdicos principalmente por Odin (conhecido como o pai de todos) que usava o hidromel como alimento e bebida. Os guerreiros de Asgard festejavam suas vitórias em

batalha no palácio de Valhala (o mais belo de todos os palácios de Asgard, residência de Odin) com abundante hidromel, o qual era consumido tanto antes das batalhas para fortalecimento, quanto para comemorar os feitos em batalha nos festins do Valhala.

Nos primórdios da civilização humana o hidromel esteve presente nas regiões que não apresentam condições para o cultivo da vinha, permanecendo esquecido nas grandes regiões produtoras de uva (CHAGAS, 2008).

O hidromel polonês produzido em *Lublin* já foi muito popular no norte da Europa, muitas vezes produzido por monges nos mosteiros em áreas onde as uvas não podem ser cultivadas. Ele desapareceu em popularidade, no entanto, uma vez que as importações de vinho tornaram-se economicamente viáveis. Em polonês é chamado *Miodpitny*, que significa "mel potável". O hidromel era a bebida favorita entre os *szlachta* Polaco-Lituana (nobreza). Durante as Cruzadas, o príncipe polonês *Leszek*, explicou ao Papa que os cavaleiros poloneses não podiam participar das cruzadas, pois não havia hidromel na Palestina (BEER, 2013).

Na Rússia o hidromel permaneceu popular como *medovukha* e *sbiten* muito tempo depois de sua popularidade diminuir no Ocidente. *Sbiten* é muitas vezes mencionado nas obras de escritores russos relevantes do século 19, incluindo Gogol, Dostoievski e Tolstoi. Na Finlândia, um hidromel doce chamado *Sima* (cognato com *Zymurgy*), ainda é uma bebida essencial sazonal ligado ao festival finlandês *Vappu (MayDay)*. É normalmente temperado adicionando tanto a polpa quanto a casca de limão durante a fermentação secundária, os quais são adicionados para controlar a quantidade de açúcares e para atuar como um indicador da prontidão para o consumo (pois vão subir ao topo da garrafa quando a bebida está pronta) (BEER, 2013).

Hidromel etíope é chamado de *tej* e normalmente é feito em casa. Ele é aromatizado com as folhas em pó e casca de *gesho*, um agente de amargor semelhante ao do lúpulo, que é uma espécie de espinheiro. A mais doce versão e menos alcoólica é chamada de *Berz*, a qual é envelhecida durante um curto tempo. Tradicionalmente, para beber-se o *tej* utiliza-se um recipiente arredondado em forma de vaso chamado Berele. Existem evidências de que o hidromel também foi feito na Índia, Sudeste Asiático, China, Japão e África Central, sendo também mencionados

em muitas histórias antigas do norte anglo-saxônico, inclusive no poema épico *Beowulf*, e na poesia galesa conhecida como Y Gododdin (BEER, 2013).

Sua fabricação atual é realizada de maneira empírica, pois não se encontra relatos de produção em larga escala ou bibliografia técnica disponível sobre o hidromel. Muitos dos hidroméis comerciais são de fabricação em pequena escala, onde predominantemente se usa a receita nórdica, na qual se realiza o aquecimento do mel em temperatura de ebulição da água, extinguindo suas propriedades farmacológicas.

O hidromel pode ser classificado em seco, suave, licoroso e espumante, dependendo da metodologia de fabricação empregada, pois mudanças no tempo de fermentação e concentração de carboidratos advindos do mel exercerão influência sobre seu grau alcoólico (GOMEZ, 2010). Outro fator que deve ser levado em consideração é a origem floral do mel, pois pode haver variações de sabor, aroma e coloração da bebida em função das características desta (KAHOUN, 2008).

Os compostos fenólicos além de serem responsáveis pelo aroma do hidromel participam do processo de maturação auxiliando na sua conservação, pois estes compostos tem ação antioxidante, anti-inflamatória, bactericida e assumem efeitos preventivos contra o câncer (KAHOUN, 2008. PEREIRA, 2009).

No hidromel outro fator que deve ser levado em consideração é a acidez do mel, pois este influencia diretamente na fermentação. O pH variando de 3,2 a 4,5 é ótimo para que se obtenha um bom rendimento de conversão dos açúcares em etanol e gás carbônico, pois permite um excelente desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica (TOSETO, 2008. VENTURINI, 2010. ROLDÁN, 2011. CARVALHO, 1996, CHAGAS, 2008). Outro fator que deve ser levado em consideração quando se trata do mel é a alta concentração de açúcares, pois nas uvas essa concentração por vezes não é satisfatória, sendo necessária a adição de carboidratos provenientes de outras fontes para se alcançar o grau alcoólico ideal, processo chamado de chaptalização do vinho. No preparo do hidromel estes problemas não são observados, pois o mel contém alta concentração de açúcares, sendo necessária a realização de diluições para que seja possível o início da fermentação por parte dos micro-organismos (ROLDÁN, 2011. MENDES, 2010. TURHAN, 2008. IURLINDA, 2005. AL-MAMARY, 2002. NAGAI, 2006. FERREIRA, 2002. BELY, 2003. CARVALHO, 1996).

Existem outros fatores que influenciam diretamente o processo de fermentação, bem como tempo, velocidade, temperatura e tipo de fermentação. Através dessas variáveis pode-se ter diferenciações no sabor e qualidade do produto final (BELY, 2003. CARVALHO, 1996. SOUZA, 2009. CHAGAS, 2008). Isto é porque o metabolismo da levedura pode ser alterado de uma condição para outra. Por exemplo, se for empregado controle de temperatura e agitação o processo é acelerado, pois além de aumentar a cinética de fermentação melhorando-se a disponibilidade de carboidratos, facilita-se a liberação do produto pelas células do levedo. Contudo, a formação de etanol é desfavorecida uma vez que o processo fermentativo é exotérmico (FERREIRA, 2002. SOUZA, 2009. BISSON, 2001. VENTURINI, 2010. KOOB, 2006. CARVALHO, 1996).

Segundo observações experimentais este processo reduz a produção de 5-HMF e rendimento de conversão de carboidratos em etanol, se comparado a fermentações longas, onde o mosto fica estático a temperatura ambiente. Com isso as alterações metabólicas das enzimas promoverão a produção de maior taxa de etanol. Entretanto é observado um aumento da concentração de 5-HMF na bebida, o que pode ser prejudicial à qualidade dos fermentados produzidos por este processo. No entanto, estas quantidades estão muito abaixo dos limites de ingestão diários segundo o “Immediately Dangeours to Life or Health Air Concentration” que é de 100 µg/mL. Os valores obtidos através dos métodos modernos de preparo do hidromel são significativamente menores se comparado ao método clássico (receita nórdica, na qual se realiza o aquecimento do mel propiciando a reação de desidratação das hexoses produzindo maiores taxas de hidroximetil-furfurais), mostrando a importância da busca por novas tecnologias e processos para garantir ao consumidor maior qualidade dos produtos derivados de carboidratos.

## **2.4 Fermentação Alcoólica**

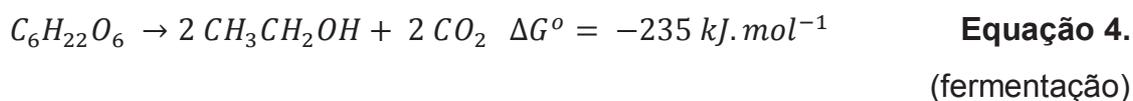
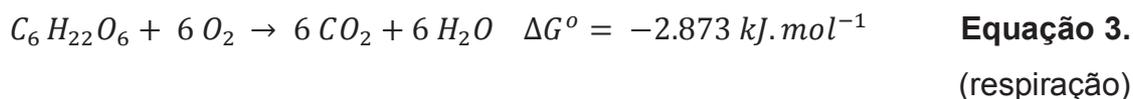
A fermentação alcoólica é o processo anaeróbico de conversão de carboidratos em etanol e gás carbônico por ação de linhagens de leveduras selecionadas, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada pelas indústrias de bebidas e sucroalcooleira. Dependendo do tipo de bebida que se deseja preparar podem-se utilizar diferentes linhagens como é o caso da *Saccharomyces uvarum* que apresenta temperatura ideal de trabalho em torno dos 10°C, frente aos 25°C da

*S. cerevisiae*, a qual é considerada levedura termotolerante podendo trabalhar em temperaturas de 20 a 40°C(SOUZA, 2009. VENTURINI, 2010. HOCKING, 2005. SOUZA, 2009. FERREIRA, 2002. CARVALHO, 1996).

A *Saccharomyces cerevisiae* possui duas fases em seu metabolismo sendo o catabolismo e o anabolismo (respiração aeróbica e anaeróbica, respectivamente). O principal tipo de substrato consumido por esta levedura é a glicose que é metabolizada com fins energéticos (produção de ATP), sendo a via glicolítica comum às duas fases de seu metabolismo. Na primeira fase, o catabolismo, a levedura consome glicose e oxigênio (solubilizado no mosto a ser fermentado) construindo a via glicolítica aeróbica. Neste momento ocorre a replicação celular até o O<sub>2</sub> ser extinto do mosto (este processo é conhecido por Ciclo de Krebs) (RETTORI, 2000. TOSETTO, 2006. KOOB, 2006).

A segunda fase do metabolismo é o anabolismo, o qual é iniciado quando não existe mais O<sub>2</sub> disponível, ou quando a glicose apresenta concentração acima do ponto crítico (C<sub>crit</sub> = 0,09 a 0,9 % de glicose), processo este chamado de repressão por glicose. Com isso a via glicolítica é construída no sentido da respiração anaeróbica consumindo glicose e água para a formação de etanol e gás carbônico. A via do catabolismo só é reconstruída quando a concentração está abaixo de C<sub>crit</sub>, pois a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais da *S. cerevisiae*. Deste modo ocorre a redução da atividade mitocondrial induzindo o piruvato a seguir a via anaeróbica formado o etanol (RETTORI, 2000. TOSETTO, 2008. KOOB, 2006. FERREIRA, 2002).

As equações químicas simplificadas do processo de catabolismo da glicose pela *S. cerevisiae*, vias aeróbicas e anaeróbicas estão descritas nas Equações 3 e 4.



O processo desenvolvido pela levedura é descrito por Retorri (2000) como diauxismo, que vem do grego e significa duplo crescimento, isto é pela possibilidade de construção das duas vias descritas anteriormente. A repressão por glicose é o fenômeno responsável pelo surgimento do diauxismo da *S. cerevisiae*, pois na presença de altos níveis de glicose (acima da  $C_{crit}$ ), os genes que codificam as enzimas necessárias para constituir a via aeróbia estão reprimidos. Assim, a glicose é fermentada produzindo etanol.

O mecanismo de repressão baseia-se na interação entre um sinal, decorrente da glicose, e a(s) proteína(s) regulatória(s) da expressão gênica, ativando proteínas repressoras ou inibindo proteínas ativadoras. Ao esgotar-se a glicose, estes genes são desreprimidos e criam-se as condições para que agora a fonte de carbono presente (o etanol - produzido pela própria *S. cerevisiae*) seja “canalizada” pela recém-reconstituída via aeróbia (RETTORI, 2000. BISSON, 2001).

Seguido ao consumo da glicose se dá o início da fermentação da frutose, a qual em presença da enzima catalítica hexoquinase e ATP formam a frutose-6-fostato, que já é um dos intermediários da via glicolítica descrita na Figura 3 (RETTORI, 2000. BISSON, 2001).

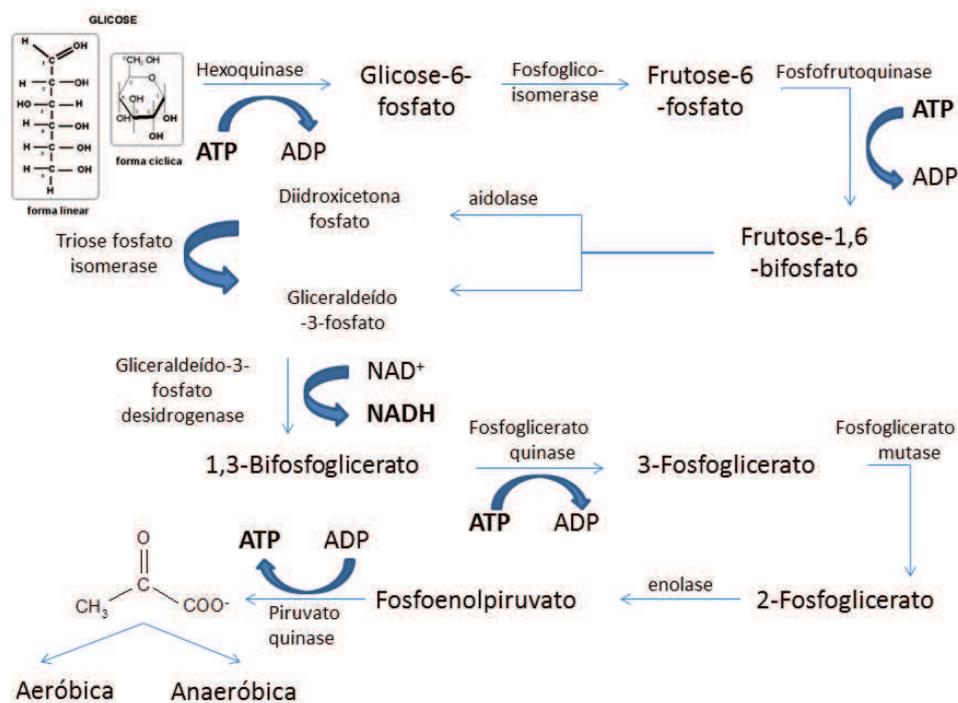


Figura 3. Via glicolítica da *S. cerevisiae* (RETTORI, 2000. BISSON, 2001).

Analisando a via glicolítica (Figura 3) seria esperada a fermentação da frutose em primeiro lugar, para depois ocorrer o consumo de glicose, mas devido à repressão por altas concentrações de glicose (acima de  $C_{crit}$ ) isso não é favorável. Portanto, a frutose presente em mostos a serem fermentados entrará na via fermentativa apenas após toda a glicose ter sido consumida (RETTORI, 2000).

Outro carboidrato facilmente encontrado em mostos cervejeiros, de cana-de-açúcar ou destinado à fabricação de vinhos é a sacarose, a qual é um dissacarídeo composto por uma unidade de frutose e outra de glicose. Sua fermentação é possível devido à ação da enzima invertase, que naturalmente faz parte do metabolismo da *S. cerevisiae*. Esta enzima atua na quebra da sacarose em suas unidades menores, para que assim seja possível a entrada na via glicolítica. Uma questão que surge é se ocorrerá novamente a repressão por alta concentração de glicose. A resposta para essa questão é negativa, pois como a glicose é gerada e logo em seguida consumida não é possível sua concentração atingir os valores de  $C_{crit}$  mencionados anteriormente, ela será fermentada em primeiro lugar, para em seguida ocorrer o consumo de frutose e ATP (RETTORI, 2000).

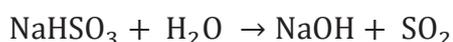
No caso da cerveja e do hidromel ocorre à presença da maltose, um carboidrato composto por duas unidades de glicose. Deste modo à levedura precisa sintetizar a enzima maltase que é responsável pela quebra da maltose em unidades de glicose. Este processo não é natural e sim induzido, desta forma este será o último carboidrato, sendo consumido apenas ao final do processo fermentativo, com isso em tempos mais curtos é comum se detectar concentrações maiores de maltose se comparado com processos realizados em tempos mais longos (RETTORI, 2000).

Dependendo das condições a que a levedura é submetida se podem ter as variações no metabolismo descrito anteriormente. Com isso o consumo das fontes de carbono produz: 1 % de novas células, 4 % de piruvato, acetato, acetaldeído, glicerol e lactato e 95 % de etanol e gás carbônico a partir da fonte orgânica disponível. Experimentalmente foi determinado que a concentração de levedo adequada para o processo fermentativo é de 2 a 3 % m/v, pois deste modo se equilibram a replicação celular e respiração anaeróbica, aumentando a velocidade cinética de conversão de carboidratos em etanol e gás carbônico por meio da maior concentração de células viáveis em solução (BISSON, 2001. TOSETTO, 2008. FERREIRA, 2002. RETTORI, 2000).

Dependendo da composição da matriz a ser fermentada devem-se tomar alguns cuidados com a presença de leveduras selvagens, para que desta forma não ocorra um mecanismo de competição com a *S. cerevisiae*. Estas podem causar a deterioração das bebidas, pois ao invés de ocorrer à liberação dos compostos aromáticos típicos da levedura selecionada, as selvagens vão fazer este papel junto da *Saccharomyces* o que não é interessante. Desta maneira, faz-se necessária a esterilização do mosto a ser fermentado. A substância mais utilizada para esta função é o metabissulfito de potássio (ou de sódio), que em solução de decompõe segundo as Equações 5 e 6 (HOCKING, 2005. BISSON, 2001).



**Equação 5.**



**Equação 6.**

O dióxido de enxofre liberado é o responsável pela esterilização do mosto, causando um pequeno impacto sobre o pH do mesmo, uma vez que sua concentração média empregada situa-se numa faixa de 50 a 200 mg.L<sup>-1</sup>(a concentração máxima tolerada pelo gênero *Saccharomyces* é de 200 a 500 µg/mL). Este processo contribui também para a redução do oxigênio dissolvido no mosto, reduzindo a possibilidade de ocorrer processos de oxidação que causam deterioração química dos compostos presentes nos mostos ou bebidas preparadas (HOCKING, 2005. BISSON, 2001).

Aliada aos fatores mencionados anteriormente está à produção de etanol por parte dos micro-organismos, podendo ser produzido ao longo do processo numa concentração de 16 a 17 % (v/v) (em temperaturas menores de fermentação). Esta faixa é a de maior tolerância da *Saccharomyces*, contudo em processos rotineiros observa-se que as linhagens apresentam tolerância máxima situada na faixa de 12 a 14 % (v/v) (em temperaturas maiores de fermentação), em caso de soluções com alta concentração de carboidratos. A explicação para este comportamento reside na temperatura de trabalho comumente empregada nos processos atualmente utilizados, pois o processo fermentativo pode ser inibido pelo aquecimento ou resfriamento dos sistemas. A *Saccharomyces* pode ser empregada em processos de baixa fermentação (12 a 14°C, sendo utilizada a espécie *uvarum*, liberando uma maior concentração de metabólitos tornando a bebida mais aromática) ou alta

fermentação (17 a 22°C, sendo utilizada a espécie *cerevisiae*, liberando uma concentração menor de metabólitos, tornando a bebida menos aromática), podendo suportar temperaturas máximas de trabalho entre 35 e 40°C (BISSON, 2001. VENTURINI, 2010. FERREIRA, 2002. KOOB, 2006. CARVALHO, 1996. SOUZA, 2009).

Estudos realizados por CHAGAS (2008) compararam o processo fermentativo de mostos compostos por glicose e mel diluído, ambos com 16 % de carboidratos totais. Os mostos preparados a partir de glicose mostraram cinética de fermentação maior em relação ao mel, com maior velocidade de formação de etanol nas 12 primeiras horas de fermentação em frascos agitados. A explicação para a menor velocidade de fermentação do mel está na sua composição química, uma vez que estas contem sulfitos, ácidos orgânicos, teor de sais de cálcio e magnésio elevados além de matéria orgânica em suspensão (CHAGAS, 2008).

Sendo assim, o emprego do mel se traduz em inibição da fermentação, menores teores de etanol no vinho final, aumento da carga de sólidos em suspensão na fermentação e floculação do fermento. A floculação leva ao acúmulo de leveduras no fundo do recipiente dificultando a conversão dos açúcares em etanol (CHAGAS, 2008). Isso torna necessária a adição substâncias clarificantes para se melhorar o aspecto do hidromel. O ácido tânico é um dos compostos mais empregados na indústria para essa função, pois apresenta características de se ligar a proteínas (normalmente causadoras de turbidez em soluções) aumentando o poder de coagulação, facilitando sua decantação deixando a bebida mais límpida. Segundo Chagas (2008) a fermentação do mel para a produção de hidromel é viável, necessitando-se apenas a otimização do tempo de fermentação para que se possa tornar o processo mais eficiente.

Embora a produção de etanol a partir de mostos de mel necessite de um tempo maior em relação àqueles preparados a partir de glicose, em tempos mais longos se observa um aumento significativo do grau alcoólico daqueles em relação a estes. Deste modo pode-se concluir que o mel é uma fonte de energia que pode ser utilizada pela *S. cerevisiae* na produção de bebidas fermentadas (CHAGAS, 2008). Segundo Sroka (2007) são necessários ainda maiores estudos para elucidarem-se quais dos componentes presentes no mel exercem influência direta sobre seu processo fermentativo.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Materiais Utilizados**

##### **3.1.1 Mel**

Os méis foram coletados em diversas regiões do Brasil pelos próprios produtores locais sendo devidamente processadas e embaladas. Após chegarem ao laboratório foram caracterizadas por métodos físico-químicos, cromatográficos e termogravimétricos, devidamente acondicionadas e classificadas em:

Mel multiflora e de maria-mole, coletados na região de Irati- PR os quais receberam a codificação de mel A e C, respectivamente. A maria-mole é uma espécie heliófita, muito abundante e frequente nas pastagens e roças abandonadas, capoeiras, beira de caminhos, clareiras das matas, perto de habitações e em terrenos baldios, formando agrupamentos densos. Também higrófila frequente em campos úmidos, beira de rios, etc. É nativa do Brasil, ocorrendo no Cerrado, Mata Atlântica.

Mel multiflora do estado de Santa Catarina obtido através da empresa Allerbest Comércio de Produtos para Laboratório, localizada em Curitiba - PR, recebendo a codificação de mel D.

Mel composto predominantemente por sucupira, hortelã e vassourinha, obtido da empresa Biomendes, localizada em Cáceres MT, ao qual foi atribuído o código mel B.

##### **3.1.2 Levedura**

Foi utilizada levedura *S. cerevisiae* da marca Munich Lallemand liofilizada, cedida pela empresa Reinerth Indústria e Comércio de Bebidas e Conservas Ltda. localizada em Guarapuava – PR.

## **3.2 Metodologia**

### **3.2.1 Preparo do Hidromel**

#### **3.2.1.1 Ativação da Levedura**

As leveduras foram ativadas pelo método de pré-inoculação da levedura, para que ocorresse a hidratação, adaptação e replicação da mesma, para isto foram utilizados 10% do mosto que se desejava fermentar, adicionando-se os seguintes sais inorgânicos:  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $0,045 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0,021 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$   $0,051 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ . Em seguida fez-se a adição de metabissulfito de potássio numa concentração de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  para a esterilização. Após este processo adicionou-se a levedura numa concentração de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de mosto, levando-se a equipamento shaker TE-420 da Tecnal por 2 horas, com temperatura de  $28^\circ\text{C}$  e agitação de 140 rpm de velocidade.

#### **3.2.1.2 Preparação do Hidromel**

O preparo do mosto para os diferentes tipos de mel foi realizado por meio de diluição em água desmineralizada, para que se obtivessem soluções com grau brix em numa faixa de 20,0 a  $22,0^\circ\text{B}$ . Após esta etapa o pé de cuba (levedura ativada) foi adicionado ao mosto para iniciar as fermentações, as quais foram divididas em dois tipos, uma sendo curta com quatro dias de fermentação em equipamento shaker a  $28^\circ\text{C}$  e 140 rpm de agitação, e a outra sendo realizado de forma estática sem agitação e temperatura ambiente (média de  $22^\circ\text{C}$ ) por quatorze dias, para os diferentes tipos de mel.

Ao final do processo fermentativo a bebida ficou sob-refrigeração numa temperatura de aproximadamente  $2^\circ\text{C}$  por sete dias, posteriormente realizou-se a primeira trasfega. Nas amostras para análise sensorial foi adicionado clarificante (da marca Rea-Tech, de pureza analítica) a uma dosagem de 0,1% (m/v), enquanto que nas amostras destinadas as análises físico-químicas e cromatográficas não foi utilizado o clarificante. Ambas as amostras foram mantidas por mais sete dias nas condições anteriormente mencionadas. Tendo realizado estes procedimentos as bebidas foram deixadas por 20 dias para a maturação a baixa temperatura, uma amostra foi escolhida de modo aleatório e alocada em barril novo com capacidade

para 5 litros de jequitibá para reserva por um período de três meses, realizando-se a reposição de 1,5 L durante o processo de envelhecimento devido às perdas por evaporação e a pequenos vazamentos apresentados pelo barril.

### **3.2.2 Análises**

#### **3.2.2.1 Medida do pH e Acidez Livre do Mel**

O método consiste da diluição do mel em água desmineralizada, seguido da medida de pH e titulação potenciométrica como descrito pelo método 174/IV do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

#### **3.2.2.2 Umidade e Grau Brix do Mel**

Este método consiste da leitura direta do mel fluído em refratômetro ABBE BioBrix em temperatura ambiente, onde se pode realizar a leitura do IR e °B da amostra, tendo sido realizado segundo o método 171/IV e 178/IV do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

#### **3.2.2.3 Análise Termogravimétrica Diferencial dos Méis**

A análise por TG/DTG/DTA foi realizada por meio do emprego de cadinho de alumina (150  $\mu$ L,  $\phi$  = 7mm), sendo utilizado uma massa de  $25,0 \pm 2,0$  mg, em atmosfera dinâmica de ar com fluxo de  $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , em um intervalo de temperatura de 25 – 650°C. Empregou-se rampa de aquecimento linear de  $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  e papel de fibra de vidro como suporte para amostra de mel.

#### **3.2.2.4 Análise de pH dos Mostos e Hidroméis**

As determinações do pH das bebidas foram feitas por meio da imersão direta de pHmetro de bancada Quimis Q400BD previamente calibrado em tampão pH 4 e 7, as medidas foram realizadas a temperatura ambiente utilizando um volume de 15 mL de amostra.

#### **3.2.2.5 Acidez Livre dos Mostos e Hidroméis**

A acidez livre dos mostos e hidroméis foi determinada por meio de titulação ácido-base com NaOH a  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ , padronizada com solução de ácido oxálico a  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ , empregando-se o indicador fenolftaleína e bureta de 25 mL, pipetou-se 10

mL de bebida e transferiu-se para erlemeyer adicionando-se 3 gotas de indicador para posterior titulação, onde o volume de NaOH gasto multiplicado por um fator de 10 indica a acidez total em meq.L<sup>-1</sup>, segundo a Equação 7.

$$\text{Acidez Livre}_{(\text{meq}\cdot\text{L}^{-1})} = V_{\text{NaOH (mL)}} \times 10 \quad \text{Equação 7.}$$

### 3.2.3 Determinação de Grau Alcoólico dos Hidroméis

Foi determinado por meio de destilação fracionada de 90 mL de bebida, coletando-se o destilado sobre 20 mL de água deionizada. Seguido ao término da destilação foi feito o ajuste do volume obtendo-se novamente os 90 mL de partida, sendo esta solução apenas contendo etanol e água deionizada. Em seguida esta foi transferida para uma proveta onde foi feita a imersão do alcoômetro Gay-Lussac e a realizada a leitura de valor de grau alcoólico a 20°C.

### 3.2.4 Análise de Açúcares e 5-HMF por CLAE

#### 3.2.4.1 Determinação de Açúcares nos Méis e Hidroméis por CLAE

Para a quantificação dos açúcares presentes no hidromel formulado, utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters Controller 600 com injetor manual e loop de 5 µL, equipado com detector de índice de refração Waters 2414 e detector PDA Waters 2996, utilizou-se coluna analítica amino de aço inox Waters Spherisorb (4,6x250 mm, 5 µm).

A temperatura da coluna e detector foram ajustadas a 40°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila / água 80 : 20 (v/v), com fluxo de 0,8 mL / min. Acetonitrila (TEDIA) utilizada foi de grau CLAE. A água ultra pura foi obtida no sistema TKA-GenPure, todos os solventes foram previamente filtrados por membrana de poliamida (Sartorius). Os padrões utilizados de glicose anidra (D (+) glicose) e frutose (D (-) frutose) puríssima são da marca VETEC.

#### 3.2.4.2 Determinação do 5-hidroxi-2-metil-furfural no Hidromel por CLAE

Na determinação do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (5-HMF) utilizou-se o sistema HPLC Waters Controller 600 com detector PDA Waters 2996, e coluna

Waters  $\mu$ Bondapak C-18 (3,9x300 mm, 5  $\mu$ m). A temperatura da coluna foi ajustada a 25°C.

O padrão do 5-HMF 99% utilizado foi da marca FLUKA. As soluções padrões de 5-HMF foram preparados em diversas concentrações (em água ultra pura), para a construção da curva analítica.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila / água (ácido acético 1%) – 20:80 (v/v). A solução padrão foi injetada em triplicata e utilizando-se o método comparativo obteve-se a concentração do 5-HMF presente na amostra através do software empower™.

### **3.2.5 Análise Sensorial dos Hidroméis**

A presente pesquisa teve seu projeto submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro/PR (registro nº04694812.3.0000.0106, parecer nº101.694 / 2012).

Aos participantes da análise sensorial foram informados detalhes da pesquisa e os procedimentos a serem utilizados, assegurando-se a proteção da privacidade. Esses foram convidados a participar dos testes, sendo selecionados aqueles que obtiveram rendimento satisfatório no treinamento e manifestaram seu consentimento assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE, Anexo I), conforme a Resolução nº196/96 do Ministério da Saúde (Brasil, 2003).

As amostras de hidromel foram submetidas à avaliação sensorial para averiguar a preferência, perfil de atributos e Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). Os julgadores realizaram os testes em cabines individuais, com luz branca, em temperatura ambiente (25 $\pm$ 1 °C). Cada julgador recebeu as amostras de hidromel (acondicionado a temperatura de 6 a 10 °C) em copos de cafezinho, devidamente rotuladas e codificadas com algarismos de três dígitos escolhidos de forma aleatória, água mineral e biscoito do tipo *cream cracker* para a limpeza das papilas gustativas entre a avaliação de cada amostra, a ficha do teste correspondente se encontra no Anexo I.

Os testes foram realizados com dez provadores treinados, sendo adotado como critério de seleção o índice de acerto, o qual foi fixado em 100% (tendo o número mínimo de provadores igual a 8 segundo Lutz, 2008). Para a seleção dos julgadores foi realizado o teste de reconhecimentos de gostos básicos, para isso se

utilizou soluções de: sacarose a 2,0 % (sabor doce), ácido cítrico a 0,07 % (sabor ácido), cloreto de sódio a 0,2 % (sabor salgado), cafeína a 0,07 % (sabor amargo) e sulfato de ferro II heptahidratado a 0,0005 % (sabor metálico), as concentrações foram adaptadas segundo Córdova (2012).

Os descritores sensoriais foram determinados previamente ao treinamento dos julgadores por se tratar de um produto ainda pouco conhecido e difundido. Em seguida foram providenciados os materiais de referência (descritos anteriormente) para cada termo descritivo levantado, visando o treinamento dos julgadores e padronização de cada atributo sensorial (CÓRDOVA, 2012).

Os descritores elencados para a caracterização do hidromel preparado a partir de méis com origens florais e regionais diferenciadas para aroma foram: mel, fermentado, amargo, alcoólico e frutado; para o sabor foram: ácido, frutado, mel, doce, fermentado, alcoólico e adstringente; em relação à aparência das bebidas foi considerada a opacidade, turbidez, coloração (amarelo-dourado) e viscosidade dos produtos preparados.

Foram apresentados cinco tipos de amostras de hidromel para apreciação dos provadores. A escala utilizada para esta avaliação foi a não estruturada de 9 cm, ancorada nos pontos extremos onde foram alocados os termos: “nenhum, opaco, turvo, claro ou fino” a esquerda, e “muito intenso, translúcido, límpido, escuro ou viscoso” a direita. Os julgadores assinalaram com um traço vertical na escala a sensação percebida para cada termo descritivo. Os dados da ADQ foram obtidos medindo-se a distância, em centímetros, entre os pontos-âncoras da extremidade esquerda e o traço vertical feito pelo julgador (os modelos de fichas encontram-se no anexo I).

### **3.2.6 Análise Estatística dos Dados**

Para investigar diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos de pH e acidez e cromatográficos referentes as concentrações de carboidratos e 5-HMF presentes nos hidroméis formulados, oriundas do tipo de mel e tipo de fermentação foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores. Para determinar diferenças significativas entre os parâmetros físico-químicos dos quatro hidroméis investigados foi aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey. Toda a análise estatística foi realizada no nível de 95% de confiança usando os softwares

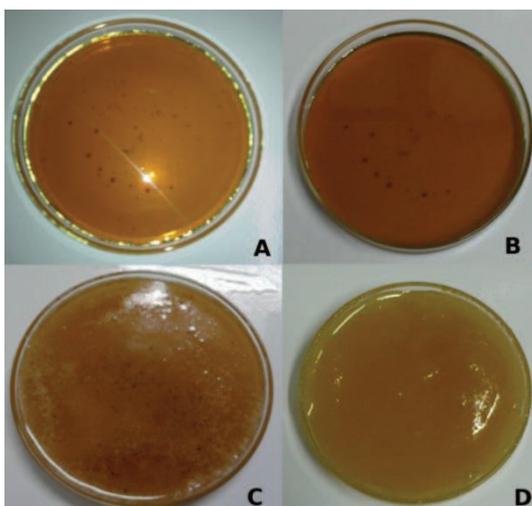
Assistat 7.6 versão beta de licença pública e o Gnumeric do projeto do GNU/Linux. Para a interpretação dos dados cromatográficos foi realizada uma análise de regressão linear simples a 95% de confiança, por meio do software QtiPlot do projeto GNU/Linux, para obtenção dos limites de detecção e quantificação de ambas as substâncias analisadas por HPLC-IR/UV. Os dados da análise sensorial foram tratados por meio do teste de Tukey a 95% de confiança, utilizando-se o software Assistat 7.6 versão beta de licença pública.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Análises dos Méis

#### 4.1.1 Análises Físico-Químicas

Os méis empregados no preparo dos hidroméis apresentaram aspectos distintos apresentando-se cristalizados (méis C e D) e fluídos (mel A e B) como se pode observar pela Figura 4. O mel multiflora da região do pantanal apresenta coloração mais escura que o mel multiflora da região de Irati no Paraná, já o mel multiflora de Santa Catarina apresentou a coloração mais clara dentre os méis, o mel unifloral de maria-mole apresentou uma coloração intermediária em relação aos demais devido ao néctar utilizado pelas abelhas provir de apenas uma planta específica, além de poder ser observado a presença de grãos de pólen dispersos.



**Figura 4. Méis utilizados na preparação dos hidroméis (A – mel multiflora - PR; B – mel multiflora - MT; C – mel maria mole - PR; D – mel multiflora - SC).**

O aroma e sabor dos méis apresentaram diferenças significativas (observado por uma análise sensorial realizada fora dos padrões em laboratório), isto é devido às diferenças entre as regiões geográficas onde foram coletados, por exemplo, o mel de B possui néctar predominante de sucupira e hortelã, enquanto que o mel A possui uma grande variedade de néctares silvestres típicos da floresta subtropical, que faz parte da mata atlântica, porém com algumas plantas particularidades do estado do Paraná como a *Araucária angustifolia*, mais conhecida como pinheiro-do-paraná.

Após a obtenção e armazenagem do mel foram realizadas as caracterizações necessárias, obtendo-se dados físico-químicos, cromatográficos e termogravimétricos dos méis.

O valor máximo de umidade em méis permitida pela legislação brasileira é de 20% (sendo a água o segundo constituinte mais abundante do mel). Os méis empregados no presente trabalho encontram-se de acordo com a Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (MAPA) (Tabela 3). O mel B que apresenta um dos menores valores de percentual de água (16,20 %) tem aparência fluída, a explicação para este fato está na concentração de frutose ( $31,031 \text{ mg.g}^{-1}$ ), que é mais elevada em relação a glicose ( $22,875 \text{ mg.g}^{-1}$ ), este fato é explicado pela maior solubilidade da frutose que tende a manter os méis fluídos quando em concentrações mais altas que a glicose.

O mel possui ainda constituintes minoritários que são responsáveis pelos valores de pH, dentre estes estão os ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos orgânicos), enzimas e outros fitoquímicos. Destacando-se os ácidos fenólicos (gálico e p-cumárico) como mais abundantes, e como minoritários os ácidos cafeíco, ferrúlico, elágico e clorogênico, siríngico, vanílico, cinâmico e p-hidroxibenzóico (ambos derivados de fenólicos). Dentre os ácidos orgânicos (cerca de 0,57 % m/m) comumente encontrados está o ácido glicônico, o qual é produto da digestão enzimática da glicose, podendo ainda ser encontrados os ácidos pirúvico, málico, cítrico, succínico e fumárico (TURHAN, 2008. IURLINDA, 2005. AL-MAMARY, 2002. ESTEVINHO, 2012. MENDES, 2010. ESTEVES, 2010/2011).

Os resultados obtidos das análises físico-química dos méis utilizados como matéria prima podem ser observados na Tabela 3. O teor de água contida no mel exerce grande influência sobre os valores de pH, pois como o perfil é prioritariamente de compostos pouco ionizáveis aliado ao efeito tampão que ocorre naturalmente neste tipo de matriz, os valores de pH serão variáveis não dependendo apenas da natureza do néctar, mas também da quantidade de água na amostra para ser possível a ionização dos ácidos anteriormente mencionados.

O pH normalmente varia de 3,2 a 4,5, porém alguns méis podem apresentar valores de pH abaixo desta faixa. O que pode ser considerado normal, pois dependendo da florada onde as abelhas coletam o néctar, o mel produzido

apresentará características de composição química diferenciadas. (VENTURINI, 2010. TOSETTO, 2008. ROLDÁN, 2011. CARVALHO, 1996).

**Tabela 3. Valores das análises físico-químicas dos diferentes tipos de mel.**

Amostras	Parâmetros Físico-Químicos			
	pH	Acidez Livre (meq.kg <sup>-1</sup> )	Umidade (%)	°B
Mel A	3,81	30,00	17,80	80,50
Mel B	3,10	34,00	16,20	82,00
Mel C	2,97	41,00	20,00	78,50
Mel D	3,01	46,00	15,80	82,50

A variação de pH dos méis utilizados apresenta algumas diferenças em relação ao comportamento anteriormente mencionado (Tabela 3), pois apenas o mel A apresenta valor de pH dentro da faixa descrita pela literatura. Os demais méis apresentam valores em torno de 2,97 a 3,10 (méis B, C e D), a explicação para este fato está na acidez livre maior, ou seja, o aumento da concentração de ácidos presentes irá deslocar os equilíbrios químicos causando redução dos valores de pH. Deste modo dependendo da composição do solo das regiões onde foi coletado o mel, das substâncias mandibulares que são introduzidas no néctar durante o seu transporte, ou associação de espécies vegetais para a sua composição, serão determinantes para as variações de pH e acidez livre no mel (ESTEVES, 2010/2011. EVANGELISTA-RODRIGUES, 2005). Isto explica o porquê do mel de maria-mole (unifloral, chamado de mel A) apresentar o menor valor de acidez, enquanto que o mel da região de Santa Catarina (multifloral, chamado de mel D) apresenta maior valor de acidez (Tabela 3).

A acidez dos méis é variável, sendo o valor máximo permitido por lei de 50 meq.L<sup>-1</sup>, se os valores excederem este limite existe a indicação de que houve fermentações indesejáveis, devido a presença de leveduras xerotolerantes, sendo estas responsáveis pelo aumento da acidez livre (ESTEVES, 2010/2011).

Contudo o parâmetro acidez livre não está diretamente relacionado com o pH, pois no mel existe a presença dos ácidos orgânicos pouco ionizáveis e minerais (cerca de 0,04 a 0,2 % m/m sendo o potássio o mais abundante, e outros em menor proporção como cálcio, cobre, ferro, manganês e fósforo).

#### 4.1.2 Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

Um fator que deve ser levado em consideração como já mencionado anteriormente é o teor de minerais contidos no mel. Desta maneira o valor obtido por TG foi utilizado para se determinar a composição total de minerais nas amostras de mel utilizadas. Segundo Felsner et.al (2004) os valores de cinzas em mel podem variar de 0,2 (valor mínimo) a 1,0 % (valor máximo permitido), dentro deste contexto apenas o mel B apresenta um percentual de cinzas no limite permitido para méis, o que pode ser considerado normal devido a sua origem floral e regional (tabela 4).

**Tabela 4. Resultados das análises termogravimétricas diferenciais para os diferentes tipos de méis.**

<b>Resultados</b> <b>Termogravimétricos</b>	<b>Tipo de Mel</b>			
	<b>Mel A</b>	<b>Mel B</b>	<b>Mel C</b>	<b>Mel D</b>
<b>Massa inicial (mg)</b>	19,884	15,141	7,824	8,033
<b>Massa residual (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>	0,616	1,010	0,485	0,386
<b>1ª etapa (% m/m)</b>	18,52	16,96	19,88	17,04
<b>2ª etapa (% m/m)</b>	38,68	40,53	38,90	40,52
<b>3ª etapa (% m/m)</b>	15,08	16,83	18,78	17,66
<b>4ª etapa (% m/m)</b>	27,41	24,01	21,82	24,30
<b>Massa seca</b>	81,17	81,37	79,50	82,48

A Tabela 4 contém os dados obtidos para as diferentes etapas do processo de decomposição térmica do mel, onde na primeira etapa ocorre à perda de água, a segunda, terceira e quarta etapas envolvem a decomposição térmica de outros componentes (eliminação dos voláteis), carbonização e oxidação da matéria orgânica, respectivamente. Os valores de umidade obtidos por meio de TG/DTG/DTA se encontram muito próximos dos obtidos por método clássico descrito por LUTZ (2008), mostrando que se podem realizar análises mais refinadas para a determinação de cinzas e percentual de água em méis (FELSNER, 2004).

Outro fato a ser observado é a comparação da massa seca obtida através da análise térmica com o grau brix dos méis, pois este mede o teor das substâncias dissolvidas (solutos) em outra (solvente), e no TG/DTA/DTG podemos observar a separação destes valores podendo-se obter uma medida mais precisa do teor de

carboidratos contido no mel, uma vez que se elimina a presença dos minerais e umidade.

Segundo Rodrigues (2008) a concentração de minerais em méis irá exercer influência sobre sua coloração, pois méis com menor teor destas substâncias apresentam coloração amarelo claro (mel D, em alguns casos os méis podem ser até incolores), enquanto que méis com maior concentração de minerais apresentam coloração mais escura (mel B, que apresenta coloração próxima do amarelo âmbar) (Figura 4).

No preparo de derivados apícolas a coloração do mel exerce grande influência, uma vez que esta será repassada ao produto final. Com isso dependendo da flora disponível em cada região se poderá ter variações no preparo do hidromel, obtendo-se bebidas com coloração que vão desde o incolor ao amarelo âmbar (RODRIGUES, 2008).

#### **4.1.3 Análises Cromatográficas dos Méis**

Quando se estuda o desenvolvimento de produtos alimentícios a partir de do mel, é muito importante conhecer a composição química dos principais compostos orgânicos e inorgânicos presentes. Devido ao mel ser composto predominante por carboidratos é importante que se conheça esse perfil, uma vez que este influencia em sua viscosidade, podendo-se ter méis totalmente fluídos ou cristalizados, pois altas concentrações de frutose tornam os méis fluídos e impede que ao longo de sua estocagem os mesmos cristalizem. O mel B apresenta essa característica de fluidez ao longo do tempo, enquanto que os demais méis cristalizam em um pequeno espaço de tempo, é importante lembrar que o fato de um mel cristalizar não indica que este possa ter sofrido adulteração.

A ação da enzima glicose oxidase é a responsável pela concentração deste carboidrato na maioria das vezes ser menor que a de frutose, pois ocorre a degradação em ácido glicônico, o qual é um dos responsáveis por aumentos de acidez em méis (Tabela 5).

**Tabela 5. Concentração de carboidratos contidos nos diferentes tipos de mel, determinados por CLAE-IR (mg.g<sup>-1</sup>).**

<b>Tipo de mel</b>	<b>Frutose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Maltose</b>
<b>Mel A</b>	31,457	46,775	4,324	<LD
<b>Mel B</b>	31,031	22,875	5,591	5,181
<b>Mel C</b>	40,161	25,362	0,0441	2,287
<b>Mel D</b>	40,592	31,035	4,962	3,853

O mel A apresenta valor de glicose maior que a frutose, porém uma explicação para este fato está na flora subtropical disponível às abelhas, ou seja, o néctar colhido pelas abelhas pode conter uma concentração maior de glicose ou maltose (que durante o processo de maturação pode ser convertida em glicose) é esperado que ocorressem mudanças no perfil de carboidratos explicando este comportamento diferenciado.

Porém dependendo da origem floral este perfil pode ser variável, e apresenta variações em relação à sacarose e maltose. O teor de sacarose além de poder ser utilizado como padrão de qualidade, também mostra o estado de maturação do mel, devido ao néctar coletado pelas abelhas ser predominantemente constituído por este carboidrato.

O processo de conversão da sacarose em frutose e glicose ocorre devido à enzima invertase (*β-D-frutofuranosidase*), que é adicionada junto do néctar durante o transporte realizado pelas abelhas, e após o sumo ser depositado na colmeia irá agir de modo a converter o máximo possível de sacarose ao longo do tempo de maturação do mel. Já a maltose é advinda das fontes florais, sendo, portanto sua concentração específica de cada região e flora onde se coleta o néctar.

O mel B apresentou valores abaixo do esperado para os valores de mono e dissacarídeos analisados, o que pode ser comparado com resultados obtidos por Bertoldi et.al (2007) que traçou o perfil destes carboidratos em méis de diferentes regiões do pantanal, onde os valores obtidos apresentam variações que podem ir de 74 a 78 %. Méis com teores de carboidratos próximos a 65 % são considerados verdes, ou seja, não passou pelo processo de maturação completo, o que pode indicar a colheita prematura do mel (o mesmo comportamento pode ser observado

em relação ao mel C), mas segundo a legislação brasileira méis de mesa devem possuir percentual de carboidratos (frutose, glicose e sacarose) acima de 60 %.

A diferença observada entre as análises térmica e de grau brix comparada com os valores obtidos por CLAE-IR é explicada pela presença de oligossacarídeos que não foram quantificados separadamente em cromatografia, o que pode ser realizado em análises futuras para que se possa compreender melhor o perfil destes carboidratos contidos nos méis do pantanal e de maria-mole.

## **4.2 Análises dos Mostos e Hidroméis**

### **4.2.1 Análises Físico-Químicas dos Mostos**

A quantidade de água contida nos méis não é suficiente para o início da fermentação por parte dos micro-organismos, pois a concentração elevada de carboidratos aliada a alta viscosidade, inibem o processo fermentativo, por isso se faz necessária a diluição do mel para que a levedura possa dar início ao processo de conversão dos carboidratos em etanol e gás carbônico.

Após as análises físico-químicas dos méis e realização das diluições necessárias, determinou-se os valores de pH e acidez livre também para os mostos (Tabela 6). A comparação da Tabela 3 com a Tabela 6 apresenta leve aumento de pH em alguns méis após a realização da diluição (com leve redução de pH para o mel A), estes fatos são explicados por dois fatores, sendo eles o emprego de metabissulfito de potássio e a realização da diluição, onde por meio da adição de anidrido sulfuroso ocorre o consumo de alguns ácidos contidos no mosto e formação de seus respectivos sais (aumentando o efeito tampão), e a diluição causa a redução na concentração destas substâncias, explicando o aumento de pH nos méis B,C e D e redução de pH no mel A (HOCKING, 2005).

A baixa variação dos valores de pH dos mostos pode ser atribuída a adição de nutrientes deslocando-se os equilíbrios químicos, produzindo ésteres ou lactonas a partir de seus respectivos ácidos contidos no mosto, levando ao efeito tampão, o qual nada mais é do que o equilíbrio químico de um ácido fraco (ácido fenólico, por exemplo) com seu respectivo sal, deste modo pequenas diluições ou adições de

bases não irão resultar em um aumento ou redução expressiva nos valores de pH (HOCKNG, 2005).

**Tabela 6. Valores da análise físico-química de pH, para os mostos preparados por diferentes tipos de méis.**

<b>Amostras</b>	<b>Mel</b>	<b>Mosto Fermentação Curta</b>	<b>Mosto Fermentação Longa</b>
<b>Mel A</b>	3,81	3,64 ± 0,55	3,43 ± 0,42
<b>Mel B</b>	3,10	3,10 ± 0,05	3,15 ± 0,10
<b>Mel C</b>	2,97	3,12 ± 0,33	3,16 ± 0,30
<b>Mel D</b>	3,01	3,13 ± 0,25	3,17 ± 0,23

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

Como se pode observar pela tabela 6, e pelos resultados da ANOVA que os dados não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tipos de mel (TM) e tempos de fermentação (TF) ( $p = 0,694$ ), e para a interação entre os fatores ( $p = 0,502$ ) a 95 % de confiança, ou seja, o pH do mel não é um fator determinante do processo fermentativo, pois os valores obtidos experimentalmente apresentam média em torno de  $3,24 \pm 0,19$ , valores os quais corroboram com estudos recentes mostrando que para se obter um bom processo fermentativo, os valores de pH devem estar na faixa de 3,2 a 4,5 (VENTURINI, 2010. TOSETTO, 2008. ROLDÁN, 2011. CARVALHO, 1996).

A acidez livre manteve-se pouco alterada nos mostos C e D em comparação com os valores dos méis (Tabela 7), apresentando aumento para os mostos A e B (Tabela 3). A explicação para este fato está nos nutrientes adicionados ao mosto e na forma com que se determina a acidez livre em méis e mostos. Pois para se determinar a acidez do mel deve-se diluir 10 gramas de mel para 75 mL de água, propiciando a obtenção de uma solução com cerca de 13,3<sup>o</sup>B, enquanto que no preparo dos mosto se dilui 27,5 gramas de mel para 100 mL, obtendo-se uma solução com cerca de 22 <sup>o</sup>B.

**Tabela 7. Valores da análise físico-química de acidez livre (meq.L<sup>-1</sup>), para os mostos obtidos a partir de diferentes tipos de méis e fermentações.**

<b>Amostras</b>	<b>Acidez dos Méis</b>	<b>Fermentação Curta</b>	<b>Fermentação Longa</b>
<b>Mosto A</b>	30,00	34,33 ± 1,15	36,67± 2,08
<b>Mosto B</b>	34,00	35,67 ± 4,04	36,33± 2,52
<b>Mosto C</b>	41,00	41,00± 1,00	42,33±3,51
<b>Mosto D</b>	46,00	46,00± 1,00	47,33±2,08

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

Em termos de dispersão dos dados de acidez para a fermentação curta e longa, não se observa diferenças significativas para os mostos preparados a partir dos quatro diferentes tipos de mel (Tabela 7). O tipo de mel devido a sua origem floral e regional diferenciadas apresentam influências sobre o hidromel a ser preparado ( $p = 0,00$ ), pois a composição e proporção de ácidos fenólicos e orgânicos presentes irão agir de forma diferenciada no processo de replicação e conversão dos carboidratos em etanol e gás carbônico pelos micro-organismos.

#### **4.2.2 Análises Físico-Químicas dos Hidroméis**

Os valores de pH dos hidroméis (Tabela 8) apresentaram um aumento em relação aos valores de pH dos mostos (Tabela 6), isto é devido ao processo fermentativo, no qual ácidos ionizáveis que apresentam contribuição para os valores deste parâmetro são consumidos. Enquanto que ácidos pouco ionizáveis são liberados pela levedura responsável pela conversão dos carboidratos em etanol e gás carbônico, contudo segundo Sroka et.al. (2007) é necessário um estudo mais aprimorado sobre este comportamento, uma vez que os estudos realizados são mais intensos nos vinhos de uva sendo requeridos maiores estudos para o hidromel, um exemplo para melhorar a compreensão do processo é a utilização do GC-MS para a determinação do perfil de compostos voláteis antes e depois do processo fermentativo (SROKA, 2007).

**Tabela 8. Valores de pH, para os fermentados obtidos por diferentes tipos de méis e fermentações.**

<b>Amostras</b>	<b>Fermentação Curta</b>	<b>Fermentação Longa</b>
<b>Hidromel A</b>	3,83 ± 0,04	3,92 ± 0,03
<b>Hidromel B</b>	3,54 ± 0,04	3,63 ± 0,07
<b>Hidromel C</b>	3,49 ± 0,07	3,61 ± 0,06
<b>Hidromel D</b>	3,50 ± 0,04	3,63 ± 0,06

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

O aumento de acidez observado (tabela 9) após a realização do processo fermentativo está nas substâncias metabólicas liberadas pela *S. cerevisiae* (cerca de 4%), estando nesse percentual contido o ácido pirúvico e acético, glicerol, acetaldeído e lactato, gerando ainda 1% de novas células e 95 % de etanol e gás carbônico. Estes valores se referem ao percentual total de matéria orgânica contido no mosto.

Dentre as substâncias mencionadas anteriormente estão ácidos pouco ionizáveis: ácido pirúvico e acético, que apresentam valores de  $K_a$  igual a  $3,2 \times 10^{-3}$  e  $1,75 \times 10^{-5}$  respectivamente, sendo os principais responsáveis pelas alterações de acidez. A formação destes compostos se dá pela via glicolítica da levedura, e são liberados para a solução ao final do processo fermentativo (BISSON, 2001).

**Tabela 9. Valores de acidez livre (meq.L<sup>-1</sup>), para os fermentados obtidos a partir de diferentes tipos de méis e fermentações.**

<b>Amostras</b>	<b>Fermentação Curta</b>	<b>Fermentação Longa</b>
<b>Hidromel A</b>	37,33 ± 1,53	41,00 ± 1,00
<b>Hidromel B</b>	42,00 ± 2,00	44,00 ± 1,00
<b>Hidromel C</b>	43,00 ± 1,73	47,00 ± 1,00
<b>Hidromel D</b>	46,67 ± 2,08	50,67 ± 0,58

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

Variações no metabolismo da levedura podem causar mudanças nas propriedades físico-químicas de bebidas, ou seja, em tempos mais curtos e com emprego de agitação e controle de temperatura o metabolismo da enzima é acelerado. Com isso o rendimento de conversão de carboidratos em etanol é desfavorecido, acarretando aumento na liberação de produtos secundários do metabolismo celular. Em fermentações longas e temperatura ambiente o metabolismo da levedura segue sua velocidade normal, com este aumento no tempo

a produção de etanol é favorecida, e a liberação de metabólitos por parte dos micro-organismos é realizado de forma natural (FERREIRA, 2002. BELY, 2003. CARVALHO, 1996. SOUZA, 2009. RETORRI, 200. BISSON, 2001).

Leves aumentos nos valores de acidez nas fermentações longas em relação às curtas podem ser observados pela Tabela 9, sendo explicados pelos fatores anteriormente mencionados, pois em períodos de tempo mais longo (14 dias de fermentação) os micro-organismos necessitam realizar a produção de maior quantidade de metabólitos, ocorrendo à liberação destes para o mosto.

A ANOVA de dois caminhos aplicada (Tabela 9) mostrou não existir diferenças significativas entre os tipos de mel e tempos de fermentação (p-valor para TF de 0,055, 0,142 para TM e 0,346 para a interação entre TM x TF a 95 % de confiança). Com isso podemos concluir que não existe relação entre o tempo de fermentação e tipo de mel no preparo dos fermentados em relação à acidez, mostrando que suas propriedades químicas relacionadas com o teor de ácidos são semelhantes.

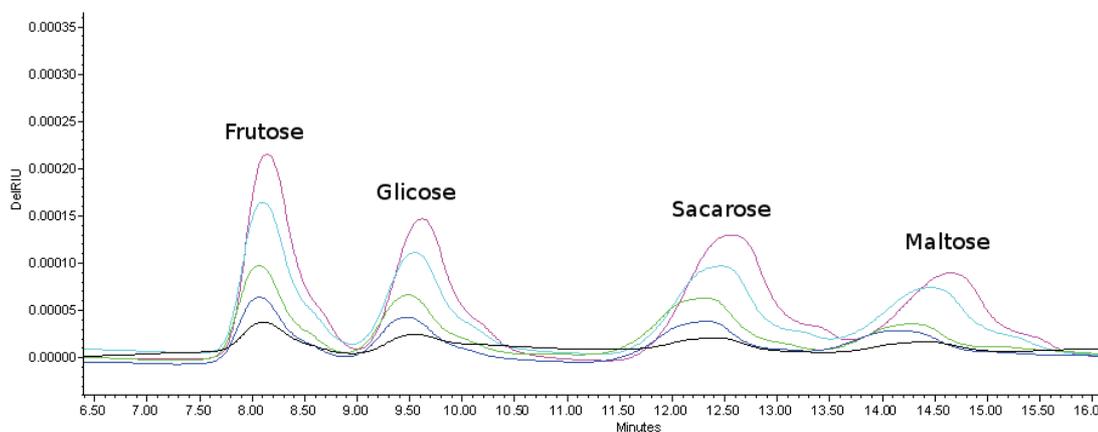
Do ponto de vista químico observa-se um aumento de 8 % na concentração de ácidos nas fermentações longas em relação às curtas, o que pode influenciar no sabor das bebidas sendo necessária a realização da análise sensorial para se determinar a aceitabilidade dessas diferenças. O aumento da acidez pode auxiliar na conservação do hidromel, pois nessas condições o ataque de bactérias e leveduras selvagens que podem degradar a bebida (provocando a produção de ácido acético, por exemplo) é desfavorecido.

#### **4.2.3 Análises Cromatográficas e Grau Alcoólico dos Hidroméis**

Aliado aos tópicos anteriormente discutidos a concentração residual de carboidratos remanescentes ao processo fermentativo variam de acordo com o tratamento realizado no mosto.

Para a compreensão do perfil de açúcares das bebidas foi realizada a análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de índice de refração (CLAE-IR). Sendo utilizado o tempo de retenção dos compostos presentes na amostra para a identificação dos compostos analisados, enquanto que a quantificação foi realizada por meio de integração da área do pico correspondente a cada tipo de carboidrato.

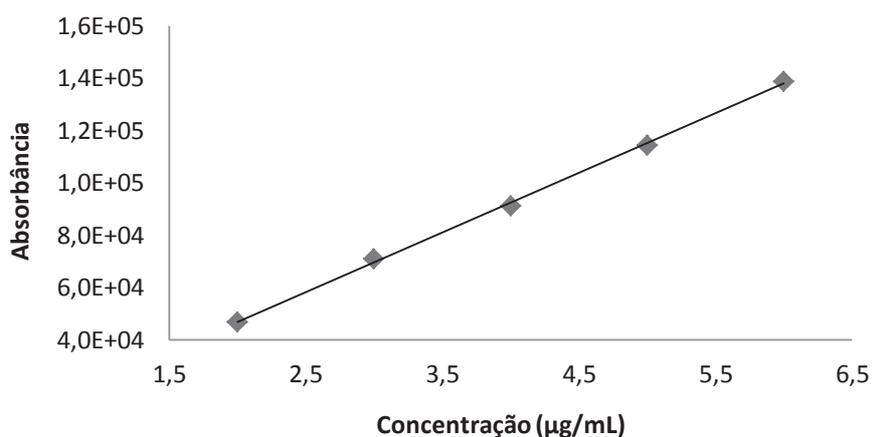
O cromatograma obtido para o perfil de carboidratos residuais é mostrado na Figura 5, onde foram utilizadas soluções de concentrações conhecidas para a construção da curva analítica, que foi adotada na quantificação dos açúcares contidos nos méis utilizados no preparo dos hidroméis.



**Figura 5. Cromatograma obtido para as curvas analíticas dos açúcares por HPLC-IR.**

Para a validação do método foi feito um ensaio de recuperação que apresentou valores de eficiência aceitáveis, onde para a frutose se obteve 93,30%, para a glicose 90,97%, para sacarose 67,23 %, para maltose 85,40 % e para o 5-hidroxi-2-metil-fruraldeído (5-HMF determinado por cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta HPLC-UV) 50 % em massa.

Através destes dados fez-se a correção das concentrações das substâncias mencionadas anteriormente, aplicando-se em seguida o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos carboidratos e 5-HMF. Segundo estudos recentes (FINGER, 2009), esta determinação é realizada levando-se em consideração as curvas analíticas empregadas para a realização da quantificação das substâncias. Segundo o cromatograma mostrado na figura 7, obtiveram-se os parâmetros da curva pelo software QtiPlot, onde se emprega as equações 8 e 9 para o cálculo de limite de detecção e quantificação.



**Figura 5. Curva analítica para o 5-HMF em bebidas por HPLC-UV.**

A partir da curva analítica apresentada na figura 7 foram extraídos o coeficiente angular da reta (2276,776) e o desvio padrão do coeficiente linear (1699,001), os quais foram empregados no cálculo dos LD's e LQ's. Apresentando boa correlação entre os dados ( $R = 0,9991$ ).

$$LD = 3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 8.}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{Equação 9.}$$

Onde:

- $LD$  é o limite de detecção;
- $LQ$  é o limite de quantificação;
- $s$  é o desvio padrão do coeficiente linear da reta;
- $S$  é o coeficiente angular da reta;

Este conceito foi empregado a todas as substâncias analisadas por HPLC obtendo-se a Tabela 10 onde estão dispostos os dados de limite de detecção e quantificação.

**Tabela 10. Valores obtidos pelas equações 5 e 6 para os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para as análises de HPLC-IR/UV..**

<b>Parâmetros</b>	<b>5-HMF (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Frutose (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Glicose (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Sacarose (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Maltose (<math>\text{mg.mL}^{-1}</math>)</b>
Limite de Detecção	0,224	3,398	4,516	0,940	1,646
Limite de Quantificação	0,746	11,326	15,052	3,135	5,488

*Médias dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ respectivamente) das análises cromatográficas.*

Com base na Tabela 10 podemos determinar as concentrações reais das substâncias mencionadas anteriormente (Tabelas 11 e 12), pois valores obtidos que se encontram abaixo do limite de detecção são considerados como ruído do sistema e por consequência esses dados não podem ser considerados válidos.

Considerando o tempo de fermentação empregado no preparo dos hidroméis a glicose e frutose foram completamente consumidas pela levedura, gerando bebidas secas (Tabela 11). Contudo no preparo de bebidas suaves o perfil de carboidratos residuais será diferenciado, este fato é explicado pela repressão por alta concentração de glicose sendo este processo o responsável pelo surgimento do diauxismo. Esta palavra vem do dialeto grego, onde di significa duplo, aux crescimento e ismo, o processo de. Portanto, quando se refere ao diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*, considera-se o fenômeno responsável por fazer a levedura apresentar dois perfis de crescimento (RETORRI, 2000).

Na presença de altos níveis de glicose (acima da  $C_{\text{crit}}$  que apresenta faixa de variação entre 0,09 a 0,9  $\text{g.mL}^{-1}$  de glicose), os genes que codificam as enzimas necessárias para constituir a via aeróbia, estão reprimidos. Assim, a glicose é fermentada produzindo etanol. O mecanismo de repressão baseia-se na interação entre um sinal, decorrente da glicose, e a(s) proteína(s) regulatória(s) da expressão gênica, ativando proteínas repressoras ou inibindo proteínas ativadoras. Ao esgotar-se a glicose, estes genes são desreprimidos e criam-se as condições para que agora a fonte de carbono presente seja “canalizada” pela recém-reconstituída via aeróbia (RETORRI, 2000).

**Tabela 11. Valores médios das concentrações dos açúcares (mg.mL<sup>-1</sup>) determinados por CLAE-IR, para os fermentados obtidos por tempos curtos de fermentação e temperatura ao ambiente.**

Amostras	Parâmetros Cromatográficos			
	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose
Hidromel A	<LD	<LD	<LQ	<LD
Hidromel B	<LD	<LD	<LD	10,697 ± 3,595
Hidromel C	<LD	<LD	<LD	5,443 ± 0,817
Hidromel D	<LD	<LD	<LD	10,656 ± 0,757

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

*<LD: Menor que o limite de detecção.*

A frutose por ser um monossacarídeo também pode permear a membrana mitocondrial da levedura, porém é necessária sua conversão em frutose-6-fosfato, por meio da reação da frutose mais adenosina trifosfato (ATP) em presença de hexoquinase (enzima responsável pela catálise da primeira fase da via glicolítica) liberando adenosina difosfato (ADP). Sendo a frutose-6-fosfato um dos intermediários da via glicolítica, a partir deste ponto dá-se sequencia as reações que levam à formação do piruvato. Estes fatos podem ser observados tanto para as fermentações curtas quanto para as longas (RETORRI, 200).

A sacarose e maltose por serem dissacarídeos não podem ser fermentadas, com isso não permeiam a membrana mitocondrial, induzindo a levedura a produzir as enzimas necessárias para a realização da quebra destes carboidratos em unidades glicosídicas menores. Para tanto a *S. cerevisiae* utiliza duas enzimas sendo elas a invertase ( $\beta$ -D-frutofuranosidase) e a maltase, as quais são responsáveis pela conversão da sacarose e maltose em frutose e glicose ou duas unidades de glicose respectivamente (RETORRI, 2000).

Realizando a comparação da tabela 11 com a tabela 12 pode-se observar que nas fermentações longas a concentração de sacarose e maltose são menores em comparação com as fermentações curtas.

**Tabela 12. Valores médios das concentrações dos açúcares (mg.mL<sup>-1</sup>) determinados por CLAE-IR, para os fermentados obtidos por tempos longos de fermentação e temperatura ao ambiente.**

Amostras	Parâmetros Cromatográficos			
	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose
Hidromel A	<LD	<LD	<LD	<LD
Hidromel B	<LD	<LD	<LD	<LD
Hidromel C	<LD	<LD	<LD	<LQ
Hidromel D	<LD	<LD	<LD	7,699 ± 1,717

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

*<LD: Menor que o limite de detecção.*

Estas diferenças nas concentrações da sacarose e maltose são explicadas pelo metabolismo da levedura, onde a repressão causada pela glicose impede que a levedura utilize das enzimas invertase e maltase para quebra destes carboidratos (RETORRI, 2000).

A *S. cerevisiae* após consumir toda a glicose e frutose inicia a fermentação da sacarose, onde cada unidade quebrada irá fornecer uma molécula de glicose e outra de frutose, as quais entram na via glicolítica como descrito anteriormente para serem convertidas em etanol (RETORRI, 2000).

Uma questão que surge é se ocorrerá novamente a repressão por glicose. Porém devido à geração seguida de consumo isto não acontece, com isso não se atinge a concentração crítica. Nos dados das concentrações de sacarose por não apresentarem consumo total, pode ser aplicada a análise de variância de dois fatores, obtendo-se os seguintes valores: 0,092 para tempo de fermentação e 0,052 para tipo de mel e interação TM x TF, mostrando não haver significância a 95 % de confiança, portanto não exercendo papel determinante no processo fermentativo (RETORRI, 2000).

O tempo necessário para que o processo de quebra da maltose em duas unidades de glicose se inicie é maior em relação aos demais, ou seja, em fermentações curtas se observa uma maior concentração residual de maltose frente às fermentações longas (vide tabelas 11 e 12). Em tempos mais longos a levedura encontra maior possibilidade de realizar o processo de síntese da maltase, e através dela realizar esta reação. Este processo exerce influência sobre a fermentação. A análise estatística realizada apresentou p-valores de 0,000 para ambos os fatores

(TM, TF e TM x TF). Com isso pode-se concluir que a maltose exerce influência nas propriedades do hidromel, pois estas concentrações são responsáveis pelo sabor residual levemente adocicado da bebida, porém devido a sua não fermentação o teor de álcool sofrerá leve redução em fermentações curtas (vide Tabela 13) (RETORRI, 2000).

Na Tabela 13 podemos observar que os valores de grau alcoólico dos fermentados obtidos, e como se pode observar os valores obtidos para as fermentações curtas é mais baixo que para as fermentações longas, apresentando boa correlação com os dados de carboidratos residuais determinados (Tabelas 11 e 12). A explicação para este fato está no metabolismo da levedura, o qual já foi descrito anteriormente.

**Tabela 13. Valores médios de grau alcoólico dos fermentados obtidos por tempos de fermentação curtos e com controle de temperatura e longos a temperatura ambiente.**

<b>Amostras</b>	<b>Fermentação Curta (°GL)</b>	<b>Fermentação Longa (°GL)</b>
Hidromel A	8,00	10,00
Hidromel B	9,00	10,00
Hidromel C	9,00	10,00
Hidromel D	9,00	10,00

*Valores obtidos empregando-se alcoômetro graduado segundo escala Gay-Lussac a 20° C.*

Os valores apresentados na Tabela 13 encontram-se muito próximos devido à escala do alcoômetro que não é sensível a pequenas variações no teor de álcool, necessitando-se a busca por novas metodologias analíticas, a razão para esta dificuldade é o ponto de ebulição da água e do etanol ser muito próximo (100 e 73°C respectivamente), dificultando o uso da análise por TG, por exemplo, pois não é possível separar as perdas de água e etanol, os quais saem no mesmo patamar de decomposição térmica da amostra analisada.

Uma solução para este problema é o uso de técnicas analíticas mais refinadas como é o caso da cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (GC-MS), através desta é possível separar estas substâncias e quantificá-las separadamente obtendo-se assim valores mais confiáveis e precisos de grau alcoólico.

Outro fator determinante para a qualidade das bebidas preparadas é a concentração de 5-HMF (Tabela 14), que é produto da desidratação dos açúcares

em meio ácido. Experimentalmente se observa que as fermentações longas apresentam maior concentração de 5-HMF em relação às curtas.

**Tabela 14. Valores médios das concentrações de 5-HMF ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) determinados por CLAE-UV para os fermentados obtidos por tempos de fermentação curtos e com controle de temperatura e longos a temperatura ambiente.**

<b>Amostras</b>	<b>5-HMF Curta</b>	<b>5-HMF Longa</b>
Hidromel A	0,395 $\pm$ 0,096	1,826 $\pm$ 0,902
Hidromel B	0,250 $\pm$ 0,219	1,076 $\pm$ 0,735
Hidromel C	0,195 $\pm$ 0,170	0,452 $\pm$ 0,167
Hidromel D	<LD	<LD

*Médias e desvios-padrão obtidos pela realização de triplicatas das análises realizadas.*

*<LD: Menor que o limite de detecção.*

O teor de 5-HMF nas fermentações longas variando de 2 a 4 vezes, em relação ao valor das fermentações curtas, este fato é devido ao aumento do tempo de exposição dos carboidratos em solução, pois a velocidade de consumo dos carboidratos é mais lenta. Aumentando-se o tempo de exposição ao meio propício para a reação de desidratação molecular, o que do ponto de vista químico não é interessante para as bebidas devido à toxicidade do 5-HMF.

Através da análise de variância foram obtidos os seguintes p-valores para o 5-HMF: 0,003 para TM, 0,024 para TF e 0,165 para interação TM x TF. Contudo estes valores observados experimentalmente se encontram abaixo do limite de ingestão diária, não apresentando riscos aos consumidores desta bebida (CHAGAS, 2008. MENDES, 2010. AL-MAMARY, 2002).

### 4.3 Análise Sensorial

As amostras utilizadas para a realização da análise sensorial foram codificadas por meio de numeração com três dígitos, para se eliminar a indução de escolha dos provadores por um determinado tipo de bebida, após a coleta dos dados as amostras foram classificadas segundo a Tabela 15 para melhor visualização dos significados dos códigos.

**Tabela 15. Codificação das amostras empregadas na análise sensorial.**

<b>Amostra de Mel</b>	<b>Código</b>	<b>Região de origem</b>	<b>Tipo de fermentação</b>	<b>Teor de açúcar</b>	<b>Envelhecido</b>
<b>A</b>	ACCN	Irati – PR	Curta	Baixo	Não
<b>A</b>	ACCE	Irati – PR	Curta	Baixo	Sim
<b>A</b>	ALCN	Irati – PR	Longa	Baixo	Não
<b>B</b>	BCVN	Pantanal – MT	Curta	Médio	Não
<b>C</b>	CCCN	Irati – PR	Curta	Baixo	Não

#### 4.3.1.1 Perfil de Atributos

As médias das notas dos atributos avaliados (cor, aroma, sabor doce, sabor residual, sabor de mel e aparência) estão descritos na Tabela 16. Destes resultados o atributo sabor de mel foi o único atributo que apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ , a 95 % de confiança), pois os méis empregados no preparo dos hidroméis foram coletados em regiões de flora consideravelmente distinta. Deste modo os méis apresentam sabores diferenciados (frutados, por exemplo), com isso notas de pêssego ou laranja são exemplos de sabor que pode ser encontrado em méis.

As amostras CCCN e BCVN receberam as maiores notas nesse atributo com médias de  $6,60 \pm 1,65$  e  $7,40 \pm 1,43$  respectivamente, as quais foram eleitas às preferidas pelos julgadores sendo a amostra preparada com o mel do Pantanal – MT a mais diferenciada em relação a este parâmetro, pois sua composição é de predominância de sucupira e hortelã, enquanto que a amostra CCCN foi preparada a partir de um mel unifloral (néctar predominante de maria-mole, coletado na região de Irati – PR).

**Tabela 16. Médias das notas atribuídas no teste sensorial de perfil de atributos dos hidroméis elaborados.**

Atributos	Amostras Analisadas				
	CCCN	ACCE	ALCN	BCVN	ACCN
Cor	6,90 ± 1,91a	6,80 ± 2,04 a	7,10 ± 1,66 a	7,50 ± 1,18 a	7,20 ± 1,48 a
Aroma	7,00 ± 1,76a	6,20 ± 1,81 a	5,50 ± 2,01 a	7,10 ± 0,99 a	5,20 ± 1,87 a
Sabor Doce	6,50 ± 1,58a	5,70 ± 2,41 a	4,50 ± 1,96 a	7,10 ± 2,13 a	4,40 ± 2,59 a
Sabor Residual	6,50 ± 1,27a	5,00 ± 2,00 a	5,20 ± 1,69 a	6,10 ± 2,42 a	5,00 ± 2,00 a
Sabor de Mel	6,60 ± 1,65ab	5,00 ± 1,94 b	4,40 ± 1,96 b	7,40 ± 1,26 a	4,80 ± 2,04 b
Aparência	6,90 ± 1,52 a	6,30 ± 1,95 a	7,00 ± 1,89 a	7,40 ± 1,43 a	6,90 ± 1,45 a

Médias e desvios padrão para os atributos sensoriais. Letras iguais na mesma linha mostram que não existem diferenças significativas entre os parâmetros avaliados a 95 % de confiança.

Com a análise sensorial das bebidas feitas do mesmo mel, mas com variação no tipo de fermentação e envelhecimento em barril, não se observou variações estatísticas a 95 % de confiança no teste de Tukey. Durante a maturação dos hidroméis em temperatura abaixo de 10° C, após algumas semanas, todos apresentaram um precipitado, resultando em um produto mais límpido e com sabor mais agradável. Este precipitado é composto principalmente por taninos e proteínas. Com este resultado surgiu à ideia de envelhecer um dos hidroméis por três meses para verificar as mudanças sensoriais da bebida.

#### **4.3.1.2 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)**

Para uma melhor investigação dos efeitos dos méis e tipos de fermentação aplicados na obtenção dos hidroméis realizou-se a análise descritiva quantitativa dos hidroméis, com isso foi avaliado o aroma, sabor e aparência das bebidas. Em relação ao perfil de aromas, os dados obtidos não apresentam diferenças significativas a 95% de confiança, e por se tratar de uma análise individual, que leva em consideração a percepção sensorial das pessoas é normal os desvios padrão encontrarem-se elevados, pois o provador dispunha de uma escala de um a nove, e poderia marcar de acordo com sua percepção sensorial à escala, da qual se é extraído posteriormente os dados quantitativos (Tabela 17). O aroma de mel apresenta-se mais intenso na amostra ALCN, em comparação com as demais (Tabela 17), mostrando que o tipo de fermentação influencia a composição

aromática do hidromel se comparado com as demais amostras preparadas a partir do mel A, contudo segundo o teste de Tukey esta variação não é considerada significativa.

**Tabela 17. Resultados do teste ADQ para aroma das bebidas.**

Atributos	Amostras Analisadas				
	CCCN	ACCE	ACCN	ALCN	BCVN
Mel	3,58 ± 2,64 a	4,36 ± 2,59 a	3,95 ± 2,99 a	6,44 ± 1,43 a	3,62 ± 2,30 a
Fermentado	4,02 ± 1,52 a	3,74 ± 1,27 a	3,97 ± 2,03 a	3,32 ± 1,38 a	4,02 ± 1,51 a
Alcoólico	4,64 ± 1,86 a	4,29 ± 1,88 a	4,27 ± 1,78 a	5,59 ± 2,03 a	4,85 ± 1,27 a
Frutado	4,16 ± 2,11 a	4,18 ± 2,27 a	3,86 ± 2,31 a	4,22 ± 2,57 a	3,76 ± 2,09 a

Médias e desvios padrão para a análise ADQ de aroma dos hidroméis. Letras iguais na mesma linha mostram que não existem diferenças significativas entre os parâmetros avaliados a 95 % de confiança.

O teste ADQ para o sabor dos hidroméis não apresenta diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para os descritores: ácido, frutado, alcoólico e adstringente. Contudo a amostra BCVN preparada a partir do mel B apresenta sabor de mel diferenciado das demais amostras, este fato é devido a sua origem regional e floral já mencionada anteriormente.

O perfil de atributos é uma ferramenta importante, através da qual se pode observar que a fermentação longa transfere propriedades melhores ao hidromel, como pode ser observado pela Tabela 18, o aroma de: mel, alcoólico e frutado na amostra ALCN são mais intensos, enquanto que o aroma de fermento é menos intenso mostrando que em termos deste parâmetro a amostra que passou pelo tempo mais longo de fermentação apresenta um conjunto de aromas mais adequado ao hidromel em comparação com as demais amostras preparadas a partir do mel multiflora – PR (ACCE e ACCN).

O sabor doce apresenta a maior variação de dados, uma vez que foram utilizados hidroméis seco e suave na análise sensorial, pois deste modo se pode determinar se o teor de carboidratos residuais irá ser um fator determinante para a aceitabilidade do produto final, o que se confirma quando analisamos a Tabela 18. As amostras BCVN e CCCN, obtiveram notas superiores às demais, com isso podemos concluir que o teor de açúcares não é um fator determinante para o consumidor e sim o tipo de mel que será empregado no processo de obtenção do hidromel.

**Tabela 18. Resultados do teste ADQ para sabor das bebidas.**

Atributos	Amostras Analisadas				
	CCCN	ACCE	ALCN	BCVN	ACCN
Ácido	4,31 ± 1,91a	4,93 ± 2,11a	4,70 ± 2,38a	4,92 ± 2,29a	4,78 ± 2,29 a
Frutado	4,42 ± 2,04a	4,21 ± 2,25a	3,05 ± 1,64a	4,10 ± 2,16a	3,34 ± 1,65 a
Mel	3,07 ± 2,45b	2,42 ± 1,36b	2,74 ± 1,60b	5,70 ± 2,29a	3,15 ± 1,43 b
Doce	4,04 ± 1,96ab	2,45 ± 1,11bc	1,54 ± 0,76c	4,81 ± 2,73a	2,02 ± 1,40 bc
Fermentado	4,19 ± 1,37ab	5,16 ± 1,84a	4,85 ± 1,24ab	2,97 ± 1,69b	4,61 ± 1,73ab
Alcoólico	5,05 ± 2,14a	6,04 ± 1,97a	5,39 ± 1,55a	6,59 ± 1,52a	4,50 ± 1,72 a
Adstringente	2,74 ± 1,97a	4,43 ± 2,77a	4,59 ± 2,33a	2,19 ± 2,15a	4,70 ± 2,14 a
Amargo	2,57 ± 1,78a	3,23 ± 2,01a	2,94 ± 2,34a	1,77 ± 2,01a	2,95 ± 1,73 a

Médias e desvios padrão para a análise ADQ de sabor dos hidroméis. Letras iguais na mesma linha mostram que não existem diferenças significativas entre os parâmetros avaliados a 95 % de confiança.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a adstringência do hidromel, pois as bebidas que apresentaram menor adstringência foram eleitas pelos julgadores como as melhores bebidas (amostras BCVN e CCCN, respectivamente). Já o sabor amargo se mostra menos intenso nas amostras BCVN e CCCN em relação às demais amostras. A amostra ACCE apresentou amargor mais acentuado que as demais, esta bebida foi envelhecida em barril de jequitibá virgem, e por se tratar do primeiro uso do mesmo ocorreu à liberação de uma grande concentração de substâncias amargas para a bebida, dentre as quais está os taninos, os quais são constituintes importantes da madeira, e que é capaz de transmitir amargor mais acentuado e coloração levemente mais escura para a bebida. Para contornar este problema se deve estudar qual o melhor tempo de envelhecimento, pois por fatores externos este foi realizado por apenas três meses, devendo-se estudar períodos mais longos (de seis meses a um ano) onde se poderá ter a suavização das características anteriormente descritas.

O sabor fermentado apresenta modificações das características em apenas duas amostras (ACCE e BCVN), ou seja, apenas o tipo de mel e o envelhecimento causam mudanças neste parâmetro, devido às modificações na composição química do hidromel durante o processo de reserva em barril. Isto é devido às extrações ocorridas da madeira e reações de oxidação durante o processo de envelhecimento,

que tendem a atenuar o sabor fermentado, porém transmitindo um sabor levemente amadeirado para a bebida.

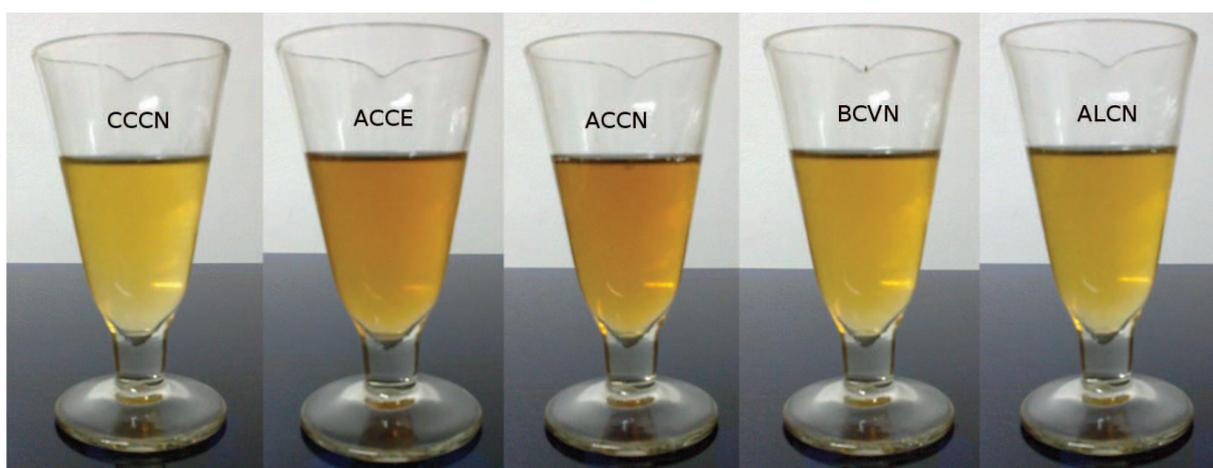
Fatores relacionados à aparência das bebidas também foram avaliadas, destacando-se a viscosidade e aparência: turva e opaca, as quais não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ , a 95 % de confiança) (Tabela 19). Contudo a cor se mostrou fator significativo nas amostras, uma vez que como mostrado anteriormente os méis utilizados no preparo das bebidas apresentaram colorações distintas (figura 8).

**Tabela 19. Resultados do teste ADQ para aparência das bebidas.**

Atributos	Amostras Analisadas				
	CCCN	ACCE	ALCN	BCVN	ACCN
Aparência Opaca	6,72±1,70a	6,18±2,06a	5,84±2,21a	6,05±1,56a	6,18±1,95a
Aparência Turva	7,23±1,55a	6,48±2,17a	5,94±2,16a	7,07±1,41a	5,94±2,19a
Cor (amarelo-dourado)	1,65±1,10c	6,63±1,75a	6,88±0,91a	2,13±1,61bc	3,89±1,52b
Viscosidade	0,99±0,57a	1,80±1,22a	1,88±1,21a	1,17±0,57a	1,68±1,34a

Médias e desvios padrão para a análise ADQ de aparência dos hidroméis.

As amostras ACCE e ACCN que foram preparadas a partir do mel A, e fermentação curta apresentam colorações muito próximas, em relação à amostra preparada por fermentação longa (Figura 8).



**Figura 6. Hidroméis empregados na análise sensorial.**

As demais amostras não apresentaram uma variação grande em relação à cor do mel de partida, comprovando que a coloração do mel é transmitida para o

hidromel, contudo se apresentando um pouco menos intensa, uma vez que se foi realizado a diluição do mesmo para sua posterior fermentação.

#### 4.3.1.3 Teste de Preferência

Os resultados da análise sensorial para preferência mostrou um resultado interessante, pois o hidromel preparado a partir de um mel considerado ruim para consumo *in natura* foi à bebida preferida pelos provadores atingindo uma nota satisfatória e com boa homogeneidade de dados. O mel multifloral do Pantanal – MT considerado um bom mel para consumo *in natura*, aparece em segundo lugar na preferência dos provadores, mostrando também que os melhores méis geram bebidas com boa aceitabilidade (Tabela 20).

**Tabela 20. Resultados da análise sensorial para o teste de preferência.**

Amostras					
Código	CCCN	BCVN	ACCE	ALCN	ACCN
Nota	7,60 ± 0,84	6,90 ± 1,60	6,20 ± 2,10	5,70 ± 1,64	4,70 ± 2,45

Valores médios e desvios padrão para o teste de preferência das amostras de hidromel analisadas, as notas foram atribuídas em relação a uma escala de 1 a 9.

O hidromel preparado a partir do mel multiflora – PR e envelhecido em barril de jequitibá (amostra ACCE) se mostrou melhor que as demais amostras preparadas a partir deste mel (amostras ALCN e ACCN, as quais passaram pelo processo de maturação em temperatura abaixo de 10°C pelo mesmo período que o hidromel envelhecido em barril), com isso as modificações observadas se devem ao processo de envelhecimento, que por meio do contato direto da bebida com a madeira promove extrações de substâncias químicas e propicia ainda processos oxidativos, onde ocorre a formação de ésteres (devido à presença de ácidos orgânicos e álcoois) os quais apresentam influência no aroma e sabor das bebidas.

A análise revelou ainda a preferência dos provadores por fermentações mais longas, pois em maiores tempos a *S. cerevisiae* libera uma maior quantidade de metabólitos (como mencionado anteriormente) dentre os quais estão contidos substâncias que irão modificar levemente a composição química do hidromel. Podendo-se chegar à conclusão de que o tipo de fermentação irá influenciar a escolha do consumidor por um determinado tipo de bebida assim como o envelhecimento, que poderá agregar maior qualidade ao produto final.

## 5. Conclusão

Com base nos dados obtidos após a determinação da composição físico-química, cromatográfica e sensorial, podemos observar que o processo fermentativo apresentou formação de graduação alcoólica média de 8,75 e 10°GL, para fermentações curtas e longas respectivamente. Os carboidratos frutose, glicose e sacarose foram completamente consumidos restando em algumas amostras baixas concentrações de maltose, evidenciando que tanto para fermentações em tempos mais reduzidos (efetuando-se o controle de temperatura e agitação) quanto em tempos mais longos (fermentação estática e temperatura ao ambiente com média de 22°C) é possível preparar o hidromel, atendendo a legislação brasileira que define a faixa de grau alcoólico de 4 a 15 % (v/v) para este tipo de bebida.

Os valores de 5-HMF obtidos foram em média  $0,210 \pm 0,041$  e  $0,839 \pm 0,198$  µg/mL, pra fermentações curtas e longas, respectivamente. Em relação a este parâmetro os tempos mais longos fornecem a maior formação de 5-hidroxi-2-metil-furfural, contudo esta concentração está muito abaixo do limite de ingestão diária que é de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Atendendo a Portaria nº 64 de 23 de abril de 2008, definida pela Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os valores médios da acidez livre das bebidas preparadas foram  $42,25 \pm 3,85$  e  $45 \pm 4,10$  meq.L<sup>-1</sup>, para fermentações curtas e longas, respectivamente. A acidez mais elevada da FL é causada pelo metabolismo da levedura, que nessas condições libera uma quantidade maior de seus metabólitos, dentre os quais está uma pequena concentração de ácido pirúvico e acético causando este aumento de acidez observado. Já o pH não responde proporcionalmente a esta influencia devido a existência do efeito tampão, causado pela presença dos ácidos orgânicos e seus respectivos sais.

A análise sensorial realizada apontou as amostras preparadas por meio dos méis de maria-mole e multiflora – MT como sendo as preferidas pelos julgadores, as quais foram preparadas por meio de fermentação curta e com diferentes variações nas concentrações carboidratos residuais, sendo a amostra CCCN seca e a BVCN suave. Deste modo se pode observar que este não é um fator determinante para escolha do consumidor. O hidromel preparado a partir do mel multiflora – PR

(amostra ACCE) e envelhecido em barril de jequitibá foi preferida dentre as demais (amostras ALCN e ACCN), pois este processo ocasiona a possibilidade de extração de substâncias aromáticas e precipitação de compostos que transmitem sabores desagradáveis a bebida. Quando comparado às amostras preparadas por diferentes tipos de fermentação ocorreu à preferência pelos tempos mais longos, sendo assim para o preparo do hidromel se recomenda fermentações mais lentas, pois assim a bebida apresentará maior aceitabilidade pelo consumidor. Com isso se for preparado o hidromel suave e empregando fermentação longa este possibilitaria a geração de um maior índice de aceitação por parte do consumidor.

Por meio de boas práticas de preparo executadas, os hidroméis obtidos conservam as propriedades benéficas do mel, uma vez que no processo apresentado pelo presente trabalho não se é aplicado, o qual se realizado acima de 40°C pode causar danos às propriedades farmacológicas do mel e hidromel, sendo possível a produção de uma bebida dentro dos padrões de qualidade para o hidromel, com a geração de novas tecnologias e processos.

Se todos os cuidados mencionados anteriormente forem tomados gera-se agregação de valor a estes produtos ainda pouco conhecidos ou consumidos no país, podendo chegar a um aumento nos rendimentos de cinco a sete vezes. Sendo um grande incentivo aos pequenos produtores de mel a permanecer no campo, e com aumento da produção de hidromel será necessário o aumento da produção de mel, mostrando-se ser uma atividade rentável e possível de ser implementada em áreas de proteção ambiental. Mostrando um grande potencial de mercado, uma vez que o fermentado de mel se encaixa no segmento de bebidas especiais, que está em ascensão na atualidade.

## 6. Referências

AL-MAMARY, M. AL-MEERI, A. AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, v. 22, p. 1041-1047, 2022.

ASSB. Cerveja: Associação Brasileira de Bartenders. Disponível em: <[www.assbb.org.br/cerveja.html](http://www.assbb.org.br/cerveja.html)>. Acesso em: 15 de dezembro de 2012.

BARBOSA, C. FALCO, V. FAIA, A.M. FERREIRA, A.M. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 108, p. 99-104, 2009.

BEER. Disponível em: <<http://www.beer100.com/history/meadhstory.htm>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2013.

BELY, M. RINALDI, A. DUBOUDIEU, D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 507-512, 2003.

BERTOLDI, F.C. REIS, V.D.A. GONZAGA, L.V. CONGRO, C.R. Caracterização físico-química e sensorial de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) produzidas no pantanal. *Evidência*, v. 7, p. 63-74, 2007.

BISSON, L. Fermentação Alcoólica. 2001. Universidade da Califórnia. Cap 3.

BLASA, M. CANDIRACCI, M. ACCORSI, A. PIACENTINI, M.P. PIATTI, E. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, v.104, p. 1635-1640, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução CNS no 196/96 e outras). 2. ed. ampliada. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 64 p.

BULFINCH, T. O Livro de Ouro da Mitologia. 26ª edição. Cap. 38, 2002.

CARVALHO, B.S. Efeito da Temperatura na Cinética de Morte Celular em Fermentação Contínua com Reciclo de Células. 1996. Dissertação (Mestrado) –

Universidade Estadual de Campinas - SP.

CHAGAS, N. V. - Estudo de Parâmetros para Produção de Bebida Fermentada a partir do Mel. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste – SP.

CHAMEEVA, T.B. NINOMIYA, M. The Japanese "drink of the Gods": economic and managerial challenges of sake production in the recent decades. 5º Congresso Internacional Acadêmico de Pesquisas e Negócios do Vinho. 2010.

CHUDZINSKA, M. BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. Food and Chemical Toxicology, v. 48, p. 284-290, 2010.

CÓRDOVA, K.R.V. Barras de Cereais com *Agaricus brasiliensis* e Minerais: Elaboração, Caracterização Física, Química e Sensorial. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Paraná – PR.

EMATER. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 20 de abril de 2012.

ENOLOGIA. Disponível em: <<http://www.google.com.br/search?client=opera&rls=pt-BR&q=apostila+de+enologia&sourceid=opera&ie=utf-8&oe=utf-8&channel=suggest>>. Acesso em: 20 de abril de 2012.

ESTEVEZ, B. Análises Bioquímicas de Méis. Externato de Penafirme. 2010/2011.

ESTEVINHO, L.M. FEÁS, X. SEIJAS, J.A. VÁSQUEZ, P.T. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. Food and Chemical Toxicology, v.50, p. 258-264, 2012.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A. SARMENTO, E.M.S. BESERRA, E.M.F. RODRIGUES, M.L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellífera* e *Melípona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. Ciência Rural, v.35, p. 1166-1171, 2005.

FELSNER, M.L. CANO, C.B. MATOS, J.R. ALMEIDA-MURADIAN, L.B. BRUNS,

R.E. Optimization of Thermogravimetric Analysis of Ash Content in Honey. Journal of the Brazilian and Chemical Society, v. 15, p. 797 – 802, 2004.

FERREIRA, L.V. Estudo da Fermentação Alcoólica em Frascos Agitados. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas – SP.

FINGER, D. Estudo da Composição Química do Extrato Oleoso de Própolis da Região de Prudentópolis – PR. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste – PR.

GUERRA, P.J. Boletim Setorial do Agronegócio. SEBRAE Recife 2011.

GULER, A. BAKAN, A. NISBET, C. YAVUZ, O. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. Food Chemistry, v. 105, p. 1119-1125, 2007.

HISTÓRIA DAS BEBIDAS ALCOÓLICAS. Disponível em: <http://www.google.com.br/search?client=opera&rls=pt-BR&q=apostila+de+enologia&sourceid=opera&ie=utf-8&oe=utf-8&channel=suggest>. Acesso em: 20 de abril de 2012.

HOCKING, M.B. Fermentation and other Microbiological Processes. Fermentation and Other Microbiological Processes. 3. ed. 2006. Cap. 16. P. 505-556.

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

JOHSON, H. The history of wine. Editora Mitchell-Beazley. Londres, 1986.

KOOB, G.F. MOAL, M.L. Alcohol. 2006. Cap. 5. p. 173-241.

LIANDA, R.L.P. Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LOUREIRO, V. MALFEITO, M.F. Spoilage yeasts in the wine industry. International

Journal of Food Microbiology, v. 86, p. 23-50, 2003.

LOPES, S.M. Estudos Preliminares de Produção de Ácido Glicônico a partir de Sacarose Invertida em Biorreatores Airlift. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos – SP.

LUTZ, A. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Cap. 6,7. 4. ed. São Paulo, IMESP, 2008.

MARCHINI, L.C. MORETTI, A.C. CARMELLO, C. OTSUK, I.P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellífera* L. no Estado de São Paulo. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, 2005.

MATUTE, A.I.R. BROKL, M. SORIA, A.C. SANZ, M.L. CASTRO, I.M. Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. Food Chemistry, v. 120, p. 637-642, 2010.

MENDES, A.F. COSME, F. BARBOSA, C. FALCO, V. INÊS, A. FAIA, A.M. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. International Journal of Food Microbiology, v. 144, p. 193-193, 2010.

MIELE, A. Técnicas de Análise Sensorial de Vinhos e Espumantes. Embrapa uva e vinho. Disponível em:

<[http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/analise\\_sensorial\\_vinhos\\_espumantes.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/analise_sensorial_vinhos_espumantes.pdf)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

MILLEN, L. Desvendando o Saquê. Disponível em:

<<http://www.gowhereregastromia.com.br/drinks-e-cia/2010/12/desvendando-o-saque/>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.

NAGAI, T. INOUE, R. KANAMORI, N. SUZUKI, N. NAGASHIMA, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. Food Chemistry, v. 97, p. 256-262, 2006.

NASUTI, C. GABBIANELLI, R. FALCIONI, G. CANTALAMESSA, F. Antioxidative and

gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research*, v. 26, p. 130-137, 2006.

NIEMES, J.P. - Preparação de Cerveja de Mel. 2010. Monografia (Graduação) - Universidade Estadual do Centro-Oeste - PR.

NORONHA, J.F. Análise Sensorial – Metodologia. Escola Superior Agrária de Coimbra – PT, 2003.

OUCHEMOUK, S. SCHWEITZER, P. BEY, M.B. DJOUDAD-KADJI, H. LOUAILECHE, H. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*, v. 121, p. 561-568, 2010.

PAES, L.C. Determinação de Cobre, Manganês e Cádmio em Mel por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite. 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas – SP.

PARANÁ. Disponível em: <<http://www.parana-online.com.br>>. Acesso em: 19 de setembro de 2012.

PEREIRA, A.P. DIAS, T. ANDRADE, J. RAMALHOSA, E. ESTEVINHO, L.M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 2057-2063, 2009.

PORTAL SAÚDE. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resultado\\_pesquisa\\_senad\\_2007.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resultado_pesquisa_senad_2007.pdf)>. Acesso em: 07 de janeiro de 2013.

RETTORI, D. VOLPE, P.L.O. Micro calorimetria: Uma Técnica Aplicável ao Estudo do Diaxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v. 22, p. 257-261, 2000.

RIBEIRO, R.O.R. Elementos Traço em Méis de Abelhas (*Apis melífera*) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: Influências da Sazonalidade. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense – RJ.

RIVALDI, J.D. SILVA, M.M. COELHO, T.C. OLIVEIRA, C.T. Characterization and sensorial profile of mead produced by *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, p. 58-63, 2009.

RODRIGUES, A.P.P. Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel. Instituto Politécnico de Bragança. 2008. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior Agrária de Bragança.

ROLDÁN, A. van MUISWINKEL, G.C.J. LASANTA, C. PALACIOS, V. CARO, I. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, v. 126, p. 574-582, 2011.

SALVATO, F. Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – SP.

SANTOS, J.R.A. GUSMÃO, N.B. GOUVEIA, E.R. Seleção de Linhagem Industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com Potencial Desempenho para a Produção de Etanol em Condições Adversas de Temperatura e de Agitação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, p. 75-80, 2010.

SILVA, R.A. Apicultura. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. Paraná 2012.

SOUZA, C.S. Avaliação da Produção de Etanol em Temperaturas Elevadas por uma Linhagem de *S. cerevisiae*. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – SP.

SORIA, A.C. CASTRO, I.M. SANZ, J. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. *Food Research International*, v. 41, p. 838-848, 2008.

SROKA, P. TSZYNSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1250-1257, 2007.

TEIXEIRA, L.V. Análise Sensorial na Indústria de Alimentos. *Revista Institucional de Laticínios Candido Torres*, v. 64, p. 12-21, 2009.

TOSETTO, G.M. Comportamento de Linhagens Industriais de *Saccharomyces* Frente a Compostos Inibitórios Presentes no Melaço de Cana-de-açúcar na

Produção de Bioetanol. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas – SP.

TURHAN, I. TETIK, N. KARHAN, M. GUREL, F. TAVUKCUOGLU, R. Quality of honeys influenced by thermal treatment. Food Science and Technology, v. 41, p. 1396-1399, 2008.

VENTURINI, W.F. Bebidas Alcoólicas. Ciência e Tecnologia. 1 ed. São Paulo: Editora Blücher, 2010.

## **Anexos**

## Anexo A: Ficha ADQ.

### Avaliação Sensorial de Hidromel

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

#### ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA - ADQ

Prove e avalie cuidadosamente a amostra de hidromel que está recebendo, e marque com um traço a intensidade percebida do atributo.

AMOSTRA Nº \_\_\_\_\_

#### AROMA

Mel |-----|

Nenhum

Muito intenso

Fermentado |-----|

Nenhum

Muito intenso

Alcoólico |-----|

Nenhum

Muito intenso

Frutado |-----|

Nenhum

Muito intenso

#### SABOR

Ácido |-----|

Nenhum

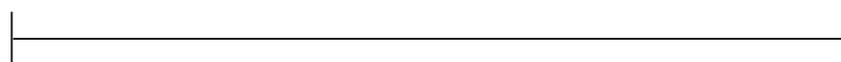
Muito intenso

Amargo |-----|

Nenhum

Muito intenso

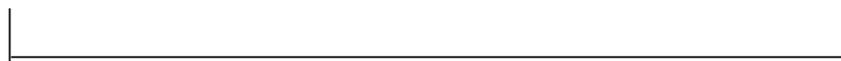
Frutado



Nenhum

Muito intenso

Mel



Nenhum

Muito intenso

Doce



Nenhum

Muito intenso

Fermentado



Nenhum

Muito intenso

Alcoólico



Nenhum

Muito intenso

Adstringente



Nenhum

Muito intenso

### APARÊNCIA

Aparência



Opaco

Translúcido

Aparência



Turvo

Límpido



## **Anexo B: Perguntas sobre consumo.**

Nome:

Data:

Perguntas sobre o consumo de bebidas alcoólicas.

1. Você possui o hábito de consumir bebidas alcoólicas em seu dia a dia.

Sim

Não

2. Quantas vezes por semana você realiza o consumo de bebidas alcoólicas.

1 vez  2 vezes  3 vezes  4 vezes  Mais de 4 vezes

3. Dentre as bebidas alcoólicas que você consome eleja a(as) qual(ais) são as mais consumidas.

Fermentados

Destilados

## Anexo C: Teste de preferencia, perfil de atributos e teste de atitude.

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

### TESTE DE PREFERÊNCIA

Você está recebendo amostras de hidromel. Avalie cada uma das amostras codificadas e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada uma das amostras.

	AMOSTRA	NOTA
9 – gostei muitíssimo		
8 – gostei muito		
7 – gostei moderadamente	_____	_____
6 – gostei ligeiramente	_____	_____
5 – nem gostei/nem desgostei	_____	_____
4 – desgostei ligeiramente	_____	_____
3 – desgostei moderadamente		
2 – desgostei muito		
1 – desgostei muitíssimo		

### PERFIL DE ATRIBUTOS

Avalie as amostras que você recebeu com relação aos atributos a seguir, sendo escores de nota de 1 a 9, onde “1” para “péssimo” e “9” para “excelente”:

ATRIBUTOS	AMOSTRAS			
	Nº _____	Nº _____	Nº _____	Nº _____
	NOTA	NOTA	NOTA	NOTA
Cor				
Aroma				
Sabor doce				
Sabor residual				
Textura				
Aparência				

### TESTE DE ATITUDE

Considerando as notas atribuídas as amostras analisadas, qual(ais) delas amostras você consideraria adquirir/comprar? \_\_\_\_\_

## Anexo D: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE- UNICENTRO  
Campus CEDETEG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA - PPGQ  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DEQ  
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA- COMEP/UNICENTRO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, **Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa (Orientador) / João Paulo Niemes (aluno de mestrado)**, aluno do Mestrado em Química Aplicada turma de 2011 da Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO venho por meio deste convidá-lo(a) a participar de uma das etapas da pesquisa que pretendo realizar sobre *Preparação e Caracterização de Hidromel Utilizando Diferentes Tipos de Méis*.

O objetivo geral dessa pesquisa é avaliar as características dos fermentados produzidos a partir de diferentes tipos de mel, e um dos objetivos específicos é fazer a análise sensorial do produto desenvolvido. A análise sensorial consiste em provar algumas amostras do alimento que lhe será apresentado, e em seguida responder algumas perguntas que você receberá em uma ficha própria. Este estudo seguirá os preceitos éticos da resolução 196/96 do Ministério da Saúde, que contém diretrizes e normas para a pesquisa com seres humanos.

Informo que é de livre escolha a participação neste estudo, e que, mesmo tendo concordado em participar, pode se recusar a responder perguntas ou mesmo retirar seu consentimento e desistir da participação, a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. Comprometo-me a não revelar seu nome. As informações serão apresentadas no trabalho sem que haja a possibilidade de você ser identificado. Os resultados deste estudo servirão como subsídio para a elaboração de trabalhos científicos.

Ao concordar com a participação no estudo, por favor, assine abaixo.

Participante: Cassia Galves  
RG: 10.866.712.5

Participante: MAICO CUNHA  
RG: 6821933-7

Participante: Sandro da Silva Santos  
RG: 97877483

Participante: Ana Elisa Chica de Souza  
RG: 47124180-5

Participante: Maryne de Barros Salgueiro  
RG: 5053335-8

Participante: Elise Azeite de Br  
RG: 8358388-6

Participante: Chaldon Nogueira Nunes  
RG: 98928618

Participante: Karin Cristiane Justi  
RG: 6.784.483-1

Participante: Dilson Fabricio Juliano  
RG: 9.469.129-0

Participante: Jamille de Souza Couca  
RG: 10.712.7473-0

Participante: Emanuel Dal Pivól Schuav  
RG: 10283992-7

Participante: WCIANA DE BIER PINTSID DE SNA  
RG: 3929647

Participante: MARCOS ROBERTO DA ROSA  
RG: 4.980.909-5

Participante: MIGUEL KALWA  
RG: 5.287.731-8

Participante: \_\_\_\_\_  
RG: \_\_\_\_\_

Código de identificação: \_\_\_\_\_

Guarapuava-PR, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

João Paulo Niemes  
Nome do aluno de pós graduação

Marcos Roberto da Rosa  
Nome do prof. orientador

**João Paulo Niemes** – Aluno do curso de Mestrado em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro Oeste.

**Marcos Roberto da Rosa** - Professor do Departamento de Química da UNICENTRO  
Rua Simeão Camargo Valela de Sá, nº03, Guarapuava-PR CEP 85040-180  
Telefone: (42) 99159269 E-mail: mrrmarco@yahoo.com.br