UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FLAVIO DE OLIVEIRA FERRAZ

**Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e
sensoriais de hidromel**

**Lorena – SP
2015**

FLAVIO DE OLIVEIRA FERRAZ

Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração Microbiologia Aplicada

Orientador: Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

Janeiro de 2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferraz, Flavio de Oliveira

Estudo dos parâmetros fermentativos,
características físico-químicas e sensoriais de
hidromel / Flavio de Oliveira Ferraz; orientador
Ismael Maciel Mancilha - ed. reimp., corr. - Lorena,
2015.

129 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2014
Orientador: Ismael Maciel Mancilha

1. Mel. 2. Fermentação. 3. Aminoácidos bioativos. 4.
Sensorial. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel,
orient.

Agradecimentos

A Deus, esta força maior que nos sustenta no dia a dia.

A meus pais, Benício e Rosa, por todo amor, sacrifício, carinho, compreensão e ajuda. A minha irmã, Fabiana, que também não poupou sacrifícios em meu favor.

Ao Professor Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela orientação, pela oportunidade de cursar este doutorado, por toda ajuda profissional e pessoal indispensável na realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Debiq, Juan, Cláudio, Bruno Guedes, Aline, Ludmila, Rafaela, Andressa, Adrieli, Germano, Felipe Montoya, Omar Uiarte e todos os demais que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho e tornaram mais suave e agradável esta jornada. Vocês serão o melhor legado e a melhor lembrança desta fase da minha vida!

Aos professores do DEBIQ, por compartilharem seus conhecimentos.

Aos funcionários e amigos do DEBIQ, Zé Carlos, André Silva, Moreira, Nicanor, pelas conversas, cafés e ajuda.

Aos colaboradores sempre solícitos e amigáveis da Biblioteca.

As secretárias e amigas Sandra, Cida e Bia, pelas conversas, cafés, ajuda e todo apoio.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

Flavio de Oliveira Ferraz, nasceu em São Bernardo do Campo em 4 de dezembro de 1980 e viveu em Santo André, até o ano de 2000.

Em 2002 ingressou na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde fez estágios em farmácia hospitalar, farmácia de manipulação e em análises de alimentos. Realizou iniciação científica e estágios voluntários no Laboratório de Análise de Alimentos desde o quarto semestre até o final do curso. Graduiu-se Farmacêutico-Bioquímico em agosto de 2007.

Em fevereiro de 2008 ingressou no Mestrado em Ciências no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, quando estudou formas de destoxificação e fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Em agosto de 2010 obteve o título de Mestre em Ciências, na área de concentração Microbiologia Aplicada.

Em setembro de 2010 deu continuidade aos estudos na pós graduação, ingressando no Doutorado do mesmo programa. Neste, focou seus estudos na avaliação dos parâmetros fermentativos e nas características físico-químicas e sensoriais de hidromel produzido em escala piloto, derivado de mosto de mel suplementado com diferentes nutrientes e envelhecidos em recipientes de diferente natureza.

RESUMO

FERRAZ, F. O. **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. 2014. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo. 2015.

Na primeira etapa deste trabalho avaliou-se o desempenho fermentativo de 6 cepas de leveduras comerciais utilizadas na produção de vinhos e cerveja, em mosto de mel 30°Brix suplementado com 0,5 g/L de peptona e 1 g/L de extrato de levedura. Como resposta determinou-se o crescimento das leveduras em número de células e as concentrações de glicose, frutose e etanol por HPLC, que permitiram determinar os parâmetros rendimento, eficiência de fermentação e produtividade em etanol, bem como a produção de sulfeto de hidrogênio. Assim, selecionou-se a cepa *Saccharomyces bayanus* – Pasteur Champagne – Red Star, que teve seu comportamento avaliado em mosto de mel suplementado com diferentes nutrientes. Os resultados demonstraram que a suplementação do mosto de mel com sais ou com suplemento comercial Enovit contribuiu para o bom desempenho da referida cepa. Na etapa seguinte, estudou-se a produção de hidromel em escala piloto a 18°C em reatores de polipropileno contendo 130 L de mosto sem suplementação (controle), suplementado com Enovit e suplementado com pedaços de maçãs (10% m/v). Terminada a fermentação, após 60 dias, o hidromel foi devidamente caracterizado físico-quimicamente quanto aos padrões de qualidade e identidade para hidromel estabelecidos pela Legislação Brasileira. Os resultados demonstraram que, com exceção da acidez total, todos os parâmetros avaliados se encontravam em consonância com os referidos padrões. Assim, as formulações estudadas foram adequadas para a obtenção de hidromel. Terminada a fermentação o hidromel foi submetido ao processo de envelhecimento a 20°C, por 216 dias, em tonel de carvalho (50L); galão de plástico (20 L); e frasco de vidro tipo bolha (20L), sendo neste período, caracterizado físico-quimicamente, bem como quanto aos teores de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, presença de aminas bioativas e compostos aromáticos derivados do tonel de carvalho. O hidromel envelhecido em galão de plástico apresentou teores de extrato seco reduzido abaixo do mínimo

estabelecido nos padrões da legislação. A utilização de maçãs como suplemento do mosto de mel resultou em hidromel com maior teor de compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante. As concentrações de aminas bioativas encontradas não comprometem a qualidade do hidromel, nem oferecem risco à saúde do consumidor. A análise de compostos fenólicos dos hidroméis envelhecidos em tonel de carvalho revelou que o processo de envelhecimento promoveu a extração de furfural, vanilina e ácido gálico, compostos que contribuem para o perfil sensorial da bebida, ficaram abaixo do limiar de percepção sensorial, fato que pode ser alterado pelo aumento do tempo de envelhecimento. Quanto a intenção de compra, os hidroméis avaliados apresentaram mais de 50% de notas variando entre 3 (tenho dúvidas se compraria) e 5 (certamente compraria), sendo os de melhor aceitação envelhecidos em recipientes de plástico e vidro. A análise sensorial revelou pouca influência do recipiente de envelhecimento sobre os atributos avaliados e a intensão de compra mostrou que os provadores preferiram os hidroméis envelhecidos em recipientes inertes (vidro e plástico). Diante do exposto, conclui-se que a produção de hidromel e seu posterior envelhecimento, por 216 dias, em recipientes inertes ou em tonéis de carvalho recondicionados, resultam em bebidas que apresentam boa aceitação, sendo uma alternativa viável para apicultores diversificarem a sua produção.

Palavras-chaves: Mel. Fermentação. Aminas bioativas. Sensorial.

ABSTRACT

FERRAZ. F. O. **Study of the fermentative parameters, physicochemical and sensory characteristics of mead**. 2014. 129 p. Thesis (Doctor of Science). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo. 2015.

In the first stage of this work it was evaluated the fermentation performance of six commercial strains of yeast used in the of wine and beer production in honey wort 30 °Brix supplemented with 0.5 g / L peptone and 1 g / L yeast extract. In response, it was determined the yeast growth by number of cells and concentrations of glucose, fructose and ethanol by HPLC, as well as fermentation parameters as yield, efficiency and productivity in ethanol, and the production of hydrogen sulfide. *Saccharomyces bayanus* -Pasteur Champagne - Red Star showed better fermentation performance and it was evaluated in honey wort supplemented with different nutrients. The results showed that must supplementation with salts or commercial supplement Enovit contributes to the yeast performance. In the next step, it was studied the production of mead on a pilot scale at 18 ° C in polypropylene reactors containing 130 L of wort without supplementation (control), supplemented with Enovit and supplemented with apple pieces (10% m/v). By the end of fermentation, after 60 days, mead was properly characterized physico-chemically regarding the standards of quality and identity for mead, established by Brazilian legislation. The results showed that, with the exception of total acidity, all parameters were in accordance with the standards. After the fermentation, mead was subjected to aging process at 20 ° C by 216 days in oak barrel (50L) plastic gallon (20 L) and glass bottle (20L), and was characterized physico-chemically, as well as regarding the content of total phenolics, antioxidant capacity, presence of bioactive amines and aromatic compounds derived from the oak barrel. The results showed that the mead aged in plastic gallon presented content of "reduced dried extract" below the minimum patterns stated. It was also observed that the use of apples as the must supplement resulted in honey mead with a higher content of phenolic compounds and antioxidant capacity. The concentrations of bioactive amines found do not compromise the quality of mead, neither consumer

health. The analysis of phenolic compounds in meads aged in oak barrel revealed that the aging process promoted the extraction of furfural, vanillin, gallic acid, compounds which contribute to the sensory profile of the beverage. Concentrations of these compounds were below the threshold of sensory perception, which can be changed by increasing aging time. Regarding purchase intent, all meads evaluated obtained more than 50% of positive scores, ranging between 3 (I doubt if buy) and 5 (definitely would buy), and meads aged in plastic and glass containers showed better acceptance. Sensory analysis showed little influence of the aging container on the attributes evaluated and the tasters preferred the meads aged in inert containers. So, it is concluded that the production of mead and its subsequent aging in inert containers or reconditioned oak casks, resulted in beverages that have good acceptance and are a viable alternative for beekeepers to diversify their products.

Keywords: Honey. Fermentation. Bioactive amines. Sensorial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fermentadores utilizados para produção de hidromel em escala piloto	52
Figura 2 - Recipientes utilizados para envelhecimento do hidromel. Da esquerda para a direita: garrafão de vidro tipo bolha, garrafão de plástico, tonel de carvalho (recondicionado)	53
Figura 3 Ficha apresentada para análise sensorial.....	61
Figura 4 Perfil cinético es diferentes cepas de leveduras na fermentação de meio YEP-Mel, sendo: -■- células (x107), -▲- açúcares redutores totais (g/L) e -◆- etanol (g/L). (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuveé)	63
Figura 5 - Rendimento, produtividade e eficiência em conversão dos açúcares em etanol pelas leveduras avaliadas (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuveé)	65
Figura 6 - Colônias de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivadas em meio LA contendo acetado de chumbo (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuveé). Fonte: Flavio de Oliveira Ferraz.....	68
Figura 7 Características da colônias superprodutoras (A), medio produtoras (B), pouco produtoras (C) e não produtoras (D) de sulfeto de hidrogênio.	69
Figura 8 Gráfico de Pareto para análise dos efeitos dos suplementos sobre o rendimento em etanol (Yp/s) (A), crescimento celular (B) e concentração final de etanol (C).	71
Figura 9 – (Continuação) Perfil cinético dos experimentos realizados conforme planejamento experimental (Tabela 2), sendo: -■- etanol e -◆- açúcares redutores totais (ART)	74
Figura 10 - Variação da concentração de ART (-▲-), teor alcoólico (-■-) e pH (-●-) durante a fermentação do mosto de mel Controle (A), suplementado com Enovit (B) e suplementado com maçã (C) em escala piloto	75
Figura 11 - Variação dos parâmetros físico-químicos dos hidroméis durante o envelhecimento em tonel de carvalho, frasco plástico e garrafão de vidro onde 1 –	

mosto controle; 2- mosto suplementado com Enovit e 3- mosto suplementado com maçã.....	86
Figura 12 - Variação da concentração de compostos fenólicos totais ao longo do envelhecimento dos hidroméis em diferentes recipientes, onde: 1 – mosto controle; 2 – mosto suplementado com Enovit; 3 – mosto suplementado com maçã.	90
Figura 13 - Concentração de 5-hidroximetilfurfural nos diferentes tipos de hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).....	93
Figura 14 - Concentração de furfural no hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.-tonel de carvalho; V.-frasco de vidro; P.-frasco de plástico)	95
Figura 15 - Concentração de ácido gálico nos diferentes tipos de hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).	96
Figura 16 - Concentração de vanilina nos diferentes tipos de hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).	97
Figura 17 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle)	101
Figura 18 - Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle)	102
Figura 19 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit.	103
Figura 20 Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit	104
Figura 21 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã	105
Figura 22 Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Proporções de mel:água no preparo de mosto para produção de hidromel.	30
Tabela 2 - Formulações de suplementos do mosto de mel propostas por Morse e Steinkraus (1971) (massas para 3,79 L de mosto - 1 galão)	33
Tabela 3 - Classificação de diferentes tipos de hidromel quanto às matérias primas utilizadas (adaptado de Miller, 1994; Berry, 2007)	35
Tabela 4 - Diferentes condições de tratamento térmico aplicados em mosto de mel	36
Tabela 5 - Identificação das cepas de leveduras avaliadas	48
Tabela 6 - Matriz experimental para avaliação das formulações de mosto de mel	50
Tabela 7 - Parâmetros fermentativos referentes ao desenvolvimento de <i>S. bayanus</i> (Pasteur Champagne – Red Star) em mosto de mel suplementado com diferentes sais e nutriente comercial (*)	72
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade do hidromel produzido em escala piloto.....	77
Tabela 9 - Aminoácidos bioativos ($\mu\text{g/mL}$) presentes nos hidroméis após fermentação em escala piloto	82
Tabela 10 Concentrações de Compostos Fenólicos Totais (mg/L ácido gálico) nos diferentes tipos de hidromel envelhecidos por 216 dias, em diferentes recipientes, onde: 1 – mosto controle; 2 – mosto suplementado com Enovit; 3 – mosto suplementado com maçã;	89
Tabela 11 - Atividade antioxidante dos hidroméis após o envelhecimento (expresso em % de redução do radical DPPH)	92
Tabela 12 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos presentes no em hidromel (controle) envelhecido em tonel de carvalho	98
Tabela 13 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos contidos em hidromel (Enovit) envelhecido em tonel de carvalho.....	98
Tabela 14 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos contidos em hidromel (maçã) envelhecido em tonel de carvalho.....	98

Tabela 15 - Médias das notas dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle) e envelhecido em recipientes de diferente natureza.....	101
Tabela 16 - Médias dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit e envelhecido em recipientes de diferentes naturezas ..	103
Tabela 17 - Médias dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã e envelhecido em recipientes de diferentes naturezas ...	105

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	19
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 - Mel – Caracterização, composição e propriedades físico-químicas.....	21
2.1.1 - Caracterização	21
2.1.2 – Composição e características físico-químicas do mel	21
2.1.2.1 – Carboidratos.....	22
2.1.2.2 - Umidade	23
2.1.2.3 – Resíduos minerais fixos.....	23
2.1.2.4 – Aminoácidos e Proteínas	24
2.1.2.5 – Ácidos Orgânicos.....	26
2.1.2.6 - Hidroximetilfurfural (HMF).....	26
2.1.2.7 – Compostos fenólicos.....	27
2.1.2.8 – Microbiota do Mel	28
2.2 - Hidromel.....	29
2.2.1 – Histórico.....	29
2.2.2 – Aspectos tecnológicos da produção de hidromel.....	30
2.2.2.1 – Seleção e Preparo do mel.....	30
2.2.2.2 – Preparo do mosto de mel	32
2.2.2.3 – Tratamento do mosto de mel	35
2.2.2.4 – Seleção de leveduras	37
2.2.2.5 – Processo fermentativo.....	39
2.2.2.6 – Envelhecimento do hidromel	42
2.2.4 – Capacidade Antioxidante do Hidromel.....	44
2.2.5 – Perfil e Teores de Aminoácidos Bioativos em Hidromel	46
3 - Material e métodos	48
3.1 - Mel.....	48
3.2 – Seleção e Avaliação do Desempenho de Leveduras.....	48
3.2.1 – Leveduras	48
3.2.2 - Avaliação do desempenho fermentativo das leveduras em mosto de mel	49
3.2.3 - Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	49
3.3 – Avaliação de formulações de mosto de mel	50
3.4 - Produção de hidromel em escala piloto.....	51
3.5 - Envelhecimento do hidromel.....	53
3.6 - Parâmetros Fermentativos	54
3.6.1 - Rendimento.....	54
3.6.2 - Eficiência da Fermentação ($\eta\%$).....	54
3.6.3 – Produtividade Volumétrica em etanol	54
3.7 – Avaliação físico-química	55
3.8 - Métodos analíticos.....	55
3.8.1 - Concentração de células	55
3.8.2 – Determinação da concentração de açúcares redutores totais	55
3.8.3 – Determinação da concentração de etanol, glicose e frutose	56
3.8.4 - Análise dos compostos fenólicos totais.....	56
3.8.5 - Análise da atividade antioxidante.....	56
3.8.6 - Determinação do pH.....	57

3.8.7 – Acidez total	57
3.8.8 – Acidez volátil	58
3.8.9 – Acidez fixa	58
3.8.10 – Extrato Seco Reduzido.....	58
3.8.11 – Análise de compostos fenólicos e furânicos	59
3.8.12 – Análise de aminas bioativas	60
3.9 - Avaliação Sensorial	60
4 – Resultados E DISCUSSÃO	62
4.1 - Avaliação do desempenho fermentativo de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> em mosto de mel.....	62
4.2 - Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	66
4.3. Avaliação do desempenho fermentativo de <i>S. bayanus</i> (Pasteur Champagne – Red Star) em diferentes formulações de mosto de mel.....	69
4.4 - Avaliação da produção de hidromel em escala piloto	74
4.5 Perfil e quantificação de aminas bioativas no hidromel	81
Aminas bioativas são bases orgânicas com atividade biológica produzidas por microrganismos empregados na fermentação de alimentos e bebidas e podem causar graves efeitos toxicológicos no organismo humano. (GOMES et al., 2014).	81
4.6. Avaliação dos parâmetros físico-químicos do hidromel durante o envelhecimento	83
4.7. Evolução da concentração dos compostos fenólicos durante o envelhecimento do hidromel	88
4.8. Caracterização do hidromel em relação a compostos fenólicos, furânicos e aromáticos	92
4.9. Avaliação Sensorial do Hidromel	99
4.9.1 Hidromel obtido de mosto sem suplementação (controle).....	99
4.9.2 Hidromel obtido de mosto suplementado com Enovit.....	102
4.9.3 Hidromel obtido de mosto suplementado com maçã	104
5 – Conclusões.....	108
Referências.....	110
ANEXOS	121

1 - INTRODUÇÃO

A apicultura é uma das atividades mais antigas do mundo, contribuindo para a geração de rendas por meio da produção de diversificados produtos tais como mel, geléia real, própolis, cera, pólen e hidromel, além de ser de grande importância na agricultura por ser um dos mais importantes meios de polinização.

O Brasil apresenta potencial para a produção de grandes quantidades de produtos apícolas, devido às condições edafo-climáticas, apresentando extensas áreas ocupadas com cobertura vegetal natural diversificada constituída de culturas agrícolas, pomares comerciais e áreas de reflorestamento que favorecem a apicultura.

Nos últimos 40 anos, a produção de mel no Brasil cresceu mais de 10 vezes, sendo que em 2012 a produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) foi de 41604 toneladas, colocando o Brasil entre os dez maiores produtores mundiais deste produto (SEBRAE, 2014). O grande volume deste produto destinado à exportação demonstra a importância da apicultura como atividade econômica promissora não só na geração de renda familiar, mas também como uma atividade agrária em expansão.

Dados econômicos disponibilizados pela Associação Brasileira dos exportadores de mel (ABRAMEL, 2014) demonstram que até julho de 2014 foram exportadas mais de 17 mil toneladas de mel, mil toneladas a mais que todo o mel exportado em 2013 (ABEMEL, 2014). Tomando o ano de 2011 como referência pelo melhor resultado de exportações, o Brasil já exportou em 2014 um total 43,6% superior ao mesmo período em 2011 e já gerou uma receita de, aproximadamente, US\$ 66 milhões (ABRAMEL, 2014).

O hidromel é uma bebida fermentada obtida a partir do mel, água e levedura, com teor alcoólico variando entre 4 e 14% (v/v), que pode ser suplementada com polpas ou sucos de frutas, ácido cítrico, ervas e especiarias. É uma bebida conhecida há milhares de anos, fazendo parte da história de antigas civilizações, tomando parte em rituais das mais diversas culturas, considerada afrodisíaca,

propriedade que deu origem a expressão “lua de mel”, além de ser apreciado como bebida alcoólica.

O hidromel é um produto secundário dentro da atividade apícola, de importância econômica relevante, considerando os valores alcançados por este produto. Segundo Berry (2007) o valor de uma garrafa de 750 mL de hidromel no mercado externo oscilava entre US\$ 10,9 e US\$ 20 e para produtos considerados *Premium*, esse valor pode alcançar US\$ 70. Atualmente, no mercado nacional, uma garrafa de 750 mL chega a custar R\$50,00, evidenciando uma atividade economicamente viável para o apicultor. Entretanto, a produção de hidromel ainda ocorre de maneira empírica e artesanal, demonstrando a necessidade de pesquisas que visem o aprimoramento de processo de fabricação, considerando desde a seleção do agente da fermentação, formulação do mosto, estudo dos parâmetros fermentativos, bem como a definição de padrões de identidade e qualidade do produto final.

A extensão territorial do Brasil, com suas variadas espécies de plantas e diversidade climática proporciona um grande potencial para a produção de hidromel com características físico-químicas e sensoriais peculiares. No entanto, a escassez de informações na literatura científica não permite fundamentar a produção de hidromel padronizado e de qualidade, evidenciando assim a necessidade de pesquisas que abordem as diversas etapas envolvidas na produção desta bebida.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o aprimoramento da tecnologia de produção de hidromel, visando a obtenção de um produto padronizado e com qualidade. Especificamente, objetivou-se selecionar cepas de leveduras comerciais utilizadas na produção de bebidas alcoólicas que apresentem potencial para fermentação do mosto de mel; desenvolver formulações de mosto e avaliar os parâmetros fermentativos envolvidos neste processo de produção, bem como avaliar as características físico-químicas e sensoriais do hidromel envelhecido em recipientes de diferentes materiais.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Mel – Caracterização, composição e propriedades físico-químicas

2.1.1 - Caracterização

De acordo com a Instrução Normativa nº11, de 20/11/2002 (Brasil, 2002), entende-se por mel “o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia”.

O mesmo instrumento legal classifica o mel de acordo com as seguintes características: classificação pela origem; segundo o procedimento de obtenção; segundo a apresentação e/ou processamento e pela designação (denominação de venda).

2.1.2 – Composição e características físico-químicas do mel

O mel é um produto natural com alta concentração de uma complexa mistura de açúcares (BERTONCELJ et al., 2007). A composição do mel depende tanto das fontes vegetais das quais é derivado quanto de outros fatores, como o solo, a espécie da abelha, o estado fisiológico da colônia, o estado de maturação do mel, as condições meteorológicas quando da colheita, entre outros (CRANE, 1985; CAMPOS; MODESTA, 2000; CAMPOS et al., 2001).

Como componentes do mel são conhecidas cerca de 200 substâncias, sendo as principais os carboidratos, água, minerais, proteínas, vitaminas, lipídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos e enzimas (AL-MAMARY et al., 2002; ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; BERTONCELJ et al., 2007; FINOLA et al., 2007).

O mel pode ser considerado como suplemento alimentar, uma vez que em sua constituição são encontrados elementos com importantes propriedades funcionais, como α -tocoferol, ácido ascórbico, compostos fenólicos e flavonóides (MENDES et al., 1998).

2.1.2.1 – Carboidratos

Os carboidratos são os compostos mais abundantes no mel, sendo responsáveis por suas qualidades e propriedades físico-químicas como: viscosidade, higroscopicidade, granulação, valor energético e atividade antibacteriana resultante da pressão osmótica provocada por altas concentrações de açúcares (CRANE, 1975; WHITE JÚNIOR, 1979). Além dos dois principais constituintes dessa gama de carboidratos, a glicose e a frutose, existem ainda cerca de 25 oligossacarídeos (dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos) compondo o conteúdo total de carboidratos presentes no mel (ANKLAM, 1998).

Finola et al. (2007), ao caracterizar diferentes amostras de mel da região central da Argentina, encontraram valores de 31,7% (m/m) de glicose e 41,1% (m/m) de frutose, obtendo uma razão de 1,3 (frutose/glicose). Esta proporção é dependente, principalmente, da fonte do néctar (ANKLAM, 1998) e interfere nas características físico-químicas e sensoriais do mel.

As moléculas de açúcar têm forte interação com a água presente no mel e esta interação exerce grande influência na forma física e na conservação do mel. De acordo com Kuorishi et al. (2012), no mel líquido a glicose encontra-se ligada a cinco moléculas de água e este equilíbrio é de grande importância, uma vez que no mel cristalizado esta relação muda de 5 para 1 molécula de água para cada glicose, aumentando assim a atividade de água na superfície de mel, tornando este mais suscetível à degradação por fermentação.

Enquanto a glicose, por ter solubilidade menor que a frutose, determina a tendência da cristalização do mel, sendo que a frutose interfere na doçura do mel, uma vez que tem poder adoçante maior que a glicose (FINOLA et al., 2007). Além disso, o mel com maiores taxas de frutose pode permanecer líquido por longos

períodos ou nunca cristalizar (WHITE JÚNIOR, 1979; SEEMANN; NEIRA, 1988; HORN et al., 1996) devido ao caráter higroscópico desta hexose.

Outros açúcares encontrados no mel são sacarose, maltose, isomaltose, alguns trissacarídeos e tetrasacarídeos (ANKLAN, 1998). Segundo Iurlina e Fritz (2005) a soma destes carboidratos pode chegar a 12% (m/m).

2.1.2.2 - Umidade

A água é o segundo componente em quantidade na composição do mel, variando de 15 a 21%. O conteúdo de água do mel é uma das características mais importantes, por influenciar na sua viscosidade, massa específica, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade (SEEMANN; NEIRA, 1988). O teor de umidade do mel também é um parâmetro de qualidade regulamentado pela Instrução Normativa nº11, de 20/11/2002 (BRASIL 2002), que estabelece um teor máximo de umidade permitido para méis de flores ou de melato de 20%.

O teor de umidade do mel e sua atividade de água são os principais fatores que influenciam a preservação da qualidade do produto, principalmente no tocante à degradação microbológica deste produto. A fermentação do mel é causada principalmente pela ação de leveduras osmofílicas do gênero *Saccharomyces*, naturalmente presentes neste alimento, que se multiplicam com o aumento da umidade, resultando na formação de etanol e dióxido de carbono. O álcool na presença de oxigênio poderá formar ácido acético, afetando o sabor e aroma do produto (WHITE JUNIOR, 1978; SNOWDON; CLIVER, 1996).

2.1.2.3 – Resíduos minerais fixos

O teor de resíduos minerais fixos, também denominados cinzas, é outro importante parâmetro da determinação da qualidade do mel, pois expressa os teores de minerais presentes, relacionando-o à sua origem botânica, variando entre 0,1 a 1,0% para o mel floral e mel de melato (LASCEBE; GONNET, 1974; BOGDANOV,

1999). A concentração de minerais, bem como de compostos fenólicos, exerce influência na coloração do mel, visto que os méis escuros apresentam maior teor de minerais que os méis claros (BERTONCELJ et al., 2007; ORTIZ-VALBUENA, 1998).

Dentre os minerais encontrados no mel, o potássio é o principal elemento, seguido pelo cálcio, magnésio, sódio, enxofre e fósforo. Elementos traços incluem ferro, cobre, zinco e manganês (LACHMAN et al., 2007).

O conteúdo de minerais, bem como pH, acidez, proteínas e outras substâncias, estão diretamente correlacionadas com a condutividade elétrica do mel. Este parâmetro pode ser usado como método suplementar de análise da origem do mel (AGANIN, 1971¹ apud SODRÉ, 2005). Pesquisas têm demonstrado valores para condutividade elétrica variando entre 66 e 2200 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ (CRECENTE; LATORRE, 1993; ALMEIDA, 2002), demonstrando a diversidade das características do mel de acordo com a origem geográfica onde é produzido.

2.1.2.4 – Aminoácidos e Proteínas

O conteúdo de proteínas do mel é, aproximadamente, 0,2% (ANKLAM, 1998), provenientes das fontes florais e também das próprias abelhas, que liberam enzimas tais quais a invertase, diástase, glucose oxidase e catalase (ANKLAM, 1998). Marshall e Williams (1987), utilizando eletroforese e coloração por prata na análise de diversos méis comercializados na Austrália, detectaram pelo menos 19 bandas distintas de proteínas.

Entre as proteínas contidas no mel, encontram-se enzimas tais como α -glicosidase (invertase), β -glicosidase, amilase e glicose-oxidase (WON et al, 2008), além de, diastase (α e β -amilase) e catalase (ANKLAM, 1998). Tais enzimas são de fundamental importância para determinadas características do mel como, por exemplo, o seu potencial antimicrobiano (WESTON, 2000). As atividades de algumas

¹ AGANIN, AF. Electrical conductivity of several unifloral honeys. In: SODRÉ, G.DA S. **Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do estado da Bahia.** 2000. 83p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

dessas enzimas são empregadas como indicadores de qualidade do mel (SOLOVEVE, 1971).

Segundo Weston (2000) a atividade da glicose-oxidase e da catalase agregam ao mel propriedades antimicrobianas por determinarem a quantidade de peróxido de hidrogênio contido neste. Quanto maior a atividade da glicose-oxidase e menor a atividade da catalase, maior a quantidade de peróxido de hidrogênio presente no mel.

A diastase é formada principalmente pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas, cuja função é digerir a molécula de amido presente principalmente nos grãos de pólen (PAMPLONA, 1989). A determinação da atividade diastásica é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do mel, tendo em vista a sensibilidade da enzima ao superaquecimento, fornecendo indicação sobre o grau de conservação e aquecimento do mel (SOLOVEVE, 1971).

A enzima invertase, secretada pelas abelhas, transforma 3/4 da sacarose inicial do néctar coletado nos monômeros glicose e frutose. Sua ação é contínua até que o “amadurecimento” total do mel ocorra. Dessa forma, pode-se definir o amadurecimento do mel como a inversão da sacarose do néctar pela enzima invertase e sua simultânea mudança de concentração (CAMARGO et al., 2003).

Segundo Camargo et al. (2003), a invertase conserva sua atividade por algum tempo, desde que não seja inativada pelo aquecimento. Apesar disso, o conteúdo da sacarose do mel nunca chega a zero. Essa inversão de sacarose em glicose e frutose produz uma solução mais concentrada de açúcares, aumentando a resistência do mel à deterioração por fermentação, uma vez que os monossacarídeos apresentam maior solubilidade que o dissacarídeo.

Com relação aos aminoácidos livres encontrados no mel, o que apresenta quantidades mais expressivas é a prolina, com conteúdo variando entre 50 e 85% do total de aminoácidos (WHITE, 1978). Outros aminoácidos detectados são arginina, triptofano e cisteína, sendo que o perfil de aminoácidos pode determinar tipos específicos de mel (PIRINI et al., 1992).

2.1.2.5 – Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,57% (m/m) do mel (OLAITAN, ADELEKE; OLA, 2007). A variedade de ácidos orgânicos pode ser útil na caracterização do mel (ANKLAM, 1998) e podem incluir ácidos orgânicos como: ácido glucônico, ácido pirúvico, ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido fumárico, entre outros (CHERCHI et al., 1994, WILKINS et al., 1995, ANKLAM, 1998, OLAITAN, ADELEKE; OLA, 2007).

A diversidade e quantidade destes ácidos orgânicos variam em função das diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, pela ação das bactérias durante a maturação do mel e ainda a quantidade de minerais presentes (ARAÚJO; SILVA; SOUSA, 2006), influenciando diretamente o pH do mel. De acordo com os padrões vigentes de identidade e qualidade (BRASIL, 2000), a acidez do mel não deve exceder a 50 milequivalentes por quilo de mel.

O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1 com um valor médio de 3,9 (LURTINA; FRITZ, 2005), no entanto, este parâmetro não está diretamente relacionado com a acidez livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (RODRIGUEZ et al., 2004).

2.1.2.6 - Hidroximetilfurfural (HMF)

A concentração de HMF é um parâmetro empregado para avaliar a qualidade do mel, uma vez que normalmente não está presente no mel fresco e seu conteúdo aumenta durante o acondicionamento e estocagem (SINGH et al., 1988). Sua formação ocorre durante a desidratação de hexoses catalisada por ácidos, aliada as propriedades químicas do mel, como pH, acidez total e conteúdo de minerais (FALLICO et al., 2004).

De acordo com a legislação brasileira, o mel não deve conter níveis de HMF superiores a 40 mg.kg⁻¹, entretanto a literatura consultada revela concentrações variando entre 0,0 e 471mg.kg⁻¹ (MENDES et al., 1998; SORIA et al., 2004).

2.1.2.7 – Compostos fenólicos

Compostos fenólicos formam um dos principais grupos químicos presentes em plantas, compreendendo mais de 8000 estruturas diferentes (BRAVO, 1998). Estes compostos apresentam atividades anti-carcinogênica, antiinflamatória, anti-haterogênica (previne danos às paredes dos vasos sanguíneos), além de atuar como imuno-moduladores, analgésicos e antioxidantes (VINSON et al., 1998).

Os compostos fenólicos mais frequentemente encontrados no mel são os ácidos fenólicos e flavonóides, que são considerados como potenciais marcadores da origem botânica do mel. Os ácidos fenólicos são divididos em duas subclasses: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico. Os flavonóides presentes no mel são divididos em três classes com estruturas similares: flavonois, flavonas e flavanonas (ESTEVINHO et al., 2008, ANKLAM, 1998).

Estes compostos são importantes por influenciarem a coloração, sabor e aroma do mel, além dos seus efeitos benéficos à saúde (ESTEVINHO et al., 2008). Dentre os compostos fenólicos encontrados no mel são: ácido p-hidroxibenzóico, naringenina, pinocembrina, crisina e ácido fenilacético, entre outros. Além desses, outros flavonóides são tipicamente encontrados no mel, tais como kaempferol, apigenina e pinocembina (ESTEVINHO et al, 2008; ANKLAM, 1998).

Estevinho et al. (2008) analisaram 20 amostras de mel provenientes da região de Trás os Montes, em Portugal. As amostras, inicialmente, se diferiam principalmente pela coloração, partindo desde um mel mais claro até outros com coloração mais escura. Os autores encontraram valores médios no conteúdo de compostos fenólicos que variaram entre 4,1mg/100g nas amostras de mel mais claros e 13mg/100g nos mais escuros.

Além da cor, os compostos fenólicos também conferem propriedades antioxidantes ao mel. A atividade antioxidante aferida por Estevinho et al. (2008) foi correlacionada com o conteúdo de compostos fenólicos totais, sendo a atividade maior nas amostras de mel mais escuros que os mais claros. Os resultados para a

atividade antimicrobiana seguiram o mesmo padrão, sendo mais expressiva no mel mais escuro.

2.1.2.8 – Microbiota do Mel

Além das propriedades físico-químicas, outro importante indicador da qualidade do mel é sua microbiota. Snowdon e Cliver (1996) classificaram os microrganismos presentes no mel em três categorias: 1) espécies de microrganismos que são encontrados naturalmente no mel (leveduras e bactérias formadoras de esporos); 2) espécies de microrganismos indicadores da qualidade sanitária e comercial (coliformes e/ou leveduras); 3) espécies de microrganismos que, sob determinadas condições (crescimento em alimentos não tratados termicamente) poderiam causar toxi-infecção alimentar.

Snowdon e Cliver (1996) classificaram as fontes de microrganismos encontrados no mel entre primárias e secundárias. As fontes primárias incluem o pólen, o trato digestivo das abelhas, poeira, contaminação pelo ar e sujidades das flores. Os microrganismos encontrados nas colméias são, principalmente, bactérias (*Bacillus*, *Micrococcus*), leveduras (*Saccharomyces* spp.) e bolores (*Aspergillus*), originados das abelhas, das matérias-primas (néctar) ou de outras fontes. As fontes secundárias de contaminação microbiológica do mel derivam principalmente do processamento deste pelo homem, tendo origem nas embalagens, equipamentos, ar, sujidades, insetos dentre outros vetores presentes nas áreas de manipulação.

Segundo Finola et al. (2007), os fungos e leveduras presentes no mel são responsáveis pela fermentação do mel quando a umidade ultrapassa 21%. Os fungos filamentosos mais recorrentes no mel são *Penicillium* e *Mucor*, enquanto que, entre as leveduras, as mais encontradas são *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula* (MIGDAL et al., 2000).

Esporos bacterianos, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, são regularmente encontrados no mel (FINOLA et al., 2007). Espécies de *Clostridium* são empregadas como microorganismo indicador de contaminação (COLLINS; LYNE;

GRANGE, 1999), além de causar problemas a saúde de bebês e crianças (CENTORBI, 1999) por se tratar do agente causador de botulismo.

2.2 - Hidromel

2.2.1 – Histórico

O hidromel é uma bebida fermentada consumida por diversas civilizações da antiguidade. Acredita-se que sua origem seja anterior ao vinho, de acordo com descobertas arqueológicas que revelaram indícios de sua produção na China há 9.000 anos, entre outros povos que fabricavam e consumiam a bebida (BERRY, 2007). No norte da Europa o consumo de hidromel foi considerado bastante popular, uma vez que a uva não encontrava as condições necessárias para o seu desenvolvimento. No entanto, a importação de vinho da região sul do continente, a menor custo, reduziu o consumo da bebida (PEREIRA, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa nº 64 de abril de 2008 (BRASIL, 2008), Anexo III, que regulamenta os padrões técnicos de identidade e qualidade para hidromel, o termo técnico hidromel é usado para designar a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14°GL a 20°C, obtida pela fermentação alcoólica de uma solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável.

Poucos estudos têm sido reportados na literatura sobre a produção de hidromel, demonstrando a necessidade da realização de pesquisas que visem à padronização de parâmetros importantes na sua fabricação. Sroka e Tuszynski (2007) justificaram a redução na produção de hidromel na Polônia, país que culturalmente tem o hábito da produção e consumo desta bebida, com a falta de estudos científicos sobre a bebida.

2.2.2 – Aspectos tecnológicos da produção de hidromel

2.2.2.1 – Seleção e Preparo do mel

A preparação de uma bebida alcoólica envolve uma série de fatores, tais como qualidade da matéria prima, agente da fermentação, aditivos, operações unitárias de produção, maturação, entre outros. Na produção do hidromel, o preparo do mosto, principalmente no tocante a concentração de açúcares (°Brix), bem como a determinação do final da fermentação são fatores que definem os diferentes tipos de hidromel (GUPTA; SHARMA, 2009).

Desta forma, o hidromel pode ser classificado como seco e suave ao paladar, similar aos vinhos tradicionais ou classificado como doce e encorpado. Ainda pode-se permitir que a fermentação continue após o engarrafamento, produzindo hidromel que se assemelhe a vinhos espumantes (GUPTA; SHARMA, 2009).

Segundo Sroka e Tuszynski (2007), hidromel mais fino é obtido quando o mosto é preparado com proporções de 1:0,5 (mel:água), sendo que outras proporções podem ser utilizadas, conforme demonstrado na Tabela 1

Tabela1 – Proporções de mel:água no preparo de mosto para produção de hidromel.

Referências	Teor de sólidos solúveis
Ilha et al. (2008)	21°Brix
Sroka; Tuszynski (2007)	Proporções de 1:2 e 1:3 (mel:água)
Wintersteen; Andrae; Engeseth (2005)	300 g/L de açúcares redutores
Gomes et al. (2010)	395 g/L de mel
Vidrih; Hribar (2007)	Proporção de 1:4 (mel:água) – 25% sólidos solúveis
Mendes-Ferreira et al. (2010)	22,2°Brix
Roldán et al. (2011)	12°Be (20~22°Brix)

Além de definir algumas características do hidromel produzido, a concentração de sólidos solúveis no mosto também influencia no tempo de fermentação. Sroka e Tuszynski (2007) observaram que o tempo de fermentação foi 2 vezes maior quando

o mosto foi preparado empregando 1 parte de mel para 2 de água, quando comparado com o mosto preparado na proporção de 1:3, em virtude da maior pressão osmótica existente no mosto mais concentrado.

Outro aspecto importante a ser considerado na produção de hidromel é o tipo de mel utilizado. Conforme mencionado no item 3.1, o mel é um produto de composição complexa, que varia de acordo com uma série de fatores, destacando-se a florada fonte de néctar, o estado de saúde da colméia, as condições climáticas, as boas práticas de processamento e armazenagem, dentre outros.

A cor do mel é uma característica que revela o tipo e a qualidade do mel, uma vez que esta resulta do conteúdo de minerais presentes no mel, bem como do conteúdo de pólen, da origem floral e do seu conteúdo de compostos fenólicos (BERTONCELJ et al., 2007, FINOLA et al., 2007). Pode ainda variar com a idade e as condições de armazenamento, além de estar correlacionado com a quantidade de partículas suspensas, como, por exemplo, pólen (OLAITAN et al., 2007).

Gupta e Sharma (2009) classificaram diferentes tipos de mel em 6 níveis colorimétricos, consistindo: *water white*, *white*, *extra light amber*, *light amber*, *amber* e *dark amber*. Segundo os autores o mel de coloração mais próximos ao castanho devem ser preferidos para a produção do hidromel, uma vez que a utilização de mel muito escuro resulta em hidromel com aromas desagradáveis.

Pereira et al. (2008) caracterizaram diferentes tipos de mel da região de Trás-os-Montes, Portugal e observaram que a utilização de mel mais claros, na produção de hidromel, resultou na interrupção da fermentação antes do consumo total dos açúcares. De acordo com os autores, a escassez de fontes de nitrogênio pode ter sido a causa da interrupção da fermentação quando comparado com o mosto preparado com mel mais escuro, que apresenta maior proporção de pólen, principal fonte de compostos nitrogenados do mel.

Além do desempenho fermentativo, a cor do mel revela correlação com outras propriedades do hidromel. Assim, Koguchi, Saigusa e Teramoto (2009) observaram que, nas mesmas condições de preparo do mosto, quando o hidromel é produzido com mel mais escuro apresenta maior poder antioxidante em relação ao produto fabricado com mel mais claro.

2.2.2.2 – Preparo do mosto de mel

Apesar de altas concentrações de açúcares fermentescíveis, o mel é deficiente em nitrogênio, minerais e fatores de crescimento necessários para estimular o crescimento de leveduras e consequente fermentação (GUPTA; SHARNA, 2009). Em função desta carência de nutrientes, baixo pH e baixa concentração de minerais, a produção de hidromel demanda um longo tempo de fermentação (GOMES et al., 2013). Fermentação lenta, crescimento de fungos e produção de aromas indesejados são alguns dos problemas encontrados na produção de hidromel e geralmente são associados à resposta da levedura, empregada como agente da fermentação, às condições adversas decorrentes da natureza do mosto de mel (PEREIRA et al., 2013).

De acordo com Mendes-Ferreira et al. (2010), é consenso entre os produtores de hidromel que a melhoria da qualidade desta bebida envolve o desenvolvimento de suplementos nutricionais apropriados e otimização das condições de fermentação.

As fontes de nitrogênio são os nutrientes de maior interesse por parte dos pesquisadores envolvidos com pesquisas na produção de hidromel. A limitação deste nutriente já foi explorada na produção de vinho e foi relacionada a diversos problemas, tais como atraso ou interrupção da fermentação e formação de compostos que afetam negativamente as características sensoriais do produto final (VIDRIH; HRIBAR, 2007; SPIROPOULOS et al., 2000; KUNKEE, 1991).

Desta forma, diferentes formulações de suplementos nutricionais têm sido avaliadas na produção de hidromel. Morse e Steinkraus (1971) patentearam 4 formulações (Tabela 2) para a suplementação de mosto de mel, sendo 2 para a produção de hidromel, a partir de mosto contendo de 20 a 24% de açúcares e as demais para produção de hidromel com característica espumante. Segundo estes autores, a suplementação nutricional do mosto reduz o tempo de fermentação, assim como evita o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela produção de aromas desagradáveis e aumenta a vida de prateleira do hidromel.

Mendes-Ferreira et al. (2010) avaliaram quatro diferentes formulações para suplementação de mosto de mel, associando tartarato de potássio, ácido málico e

diamônio fosfato. Os autores observaram que a adição de fosfato de diamônio favoreceu o crescimento celular, aumentou a velocidade da fermentação alcoólica e menor produção de alcoóis superiores. Além disso, a maior disponibilidade de nitrogênio resultou em maiores concentrações de compostos que conferem aroma ao hidromel, principalmente ácidos graxos de cadeia média e seus respectivos ésteres.

Tabela 2 - Formulações de suplementos do mosto de mel propostas por Morse e Steinkraus (1971) (massas para 3,79 L de mosto - 1 galão)

Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Ácido cítrico 18,9g	Fosfato de potássio 1,9g	Peptona 0,38g	Peptona 0,1g
Sulfato de amônio 4,65g	Cloreto de magnésio 0,7g	Tiamina 0,076g	Tiamina 20,0mg
Fosfato de potássio 1,9g	Peptona 0,38g	Pantotenato de cálcio 0,038g	Pantotenato de cálcio 10mg
Cloreto de magnésio 0,7g	Hidrogenosulfato de sódio 0,2g	Inositol 28mg	Inositol 7,5mg
Peptona 0,1g	Tiamina 76mg	Sulfato de amônio 3,2g	Sulfato de amônio 0,86mg
Hidrogenosulfato de sódio 0,2g	Pantotenado 38mg	Sulfato de amônio 3,2g	Piridoxine 1,0mg
Tiamina 20mg	Inositol 28mg	Piroxidina 3,8mg	Biotina 0,05mg
Pantotenato de cálcio 10mg	Piroxidina 3,8mg	Biotina 0,19mg	
Inositol 7,5mg	Biotina 0,19		
Piroxidina 1,0mg			
Biotina 0,05mg			

Gomes et al. (2013) avaliaram diferentes concentrações de Enovit (AEB Bioquímica), 60 e 120 mg/L, um suplemento comercial utilizado na produção de vinhos, em diferentes temperaturas (20 e 30 °C) para a produção de hidromel. Os resultados revelaram que a maior concentração de etanol (124,0 g/L) foi obtida a temperatura de 25°C e concentração de 90 mg/L de Enovit. Observaram também que o aumento da temperatura resultou no aumento da concentração de ácido acético, o que pode comprometer as propriedades sensoriais do hidromel.

Vidrih e Hribar (2007) estudaram as propriedades sensoriais de hidromel em função da formação de compostos aromáticos relacionados a diferentes tipos de mel. Os autores observaram que o mel com maior quantidade de pólen resultou em fermentação mais rápida que os demais, além de apresentar maiores quantidades de

compostos voláteis, tais como n-propanol e iso-butanol. As partículas de pólen, além de ser uma boa fonte de proteínas para o crescimento das leveduras, são boas para adsorverem oxigênio e outros gases no mosto (VIDRIH; HRIBAR, 2007).

A utilização de pólen em diferentes concentrações, variando entre 10 e 50 g/L, como suplemento na formulação de mosto de mel foi avaliada por Roldán et al. (2011). Os resultados mostraram que a adição de pólen aumenta a concentração de nitrogênio disponível para as leveduras de forma diretamente proporcional, favorecendo a cinética da fermentação em comparação ao mosto que não foi suplementado.

Roldán et al. (2011) avaliaram as características físico-químicas de hidromel obtido de mostos suplementados com pólen. O pH do hidromel originado de mosto suplementado com pólen foi significativamente superior ao controle. Além disso, a leitura de absorbância à 280nm foi superior no hidromel de mosto suplementado, o que pode ser resultado da extração de polifenóis, flavonóides, fosfolipídeos e proteínas contidos no pólen. A adição de pólen também favoreceu a produção de alcoóis superiores, acetato de etila e metanol, mas não alterou significativamente a produção de compostos voláteis.

Sucos de frutas, sais e ácidos orgânicos também são empregados como aditivos para estimular a fermentação e melhorar o aroma de diferentes tipos de hidromel (GUPTA; SHARNA, 2009; KOGUCHI; SAIGUSA; TERAMOTO, 2009). Segundo Gupta e Sharna (2009), bebidas de mel apresentam pouco corpo e são muito doces. Assim, frutas, na forma de suco ou em pedaços, podem ser adicionadas para contribuir com acidez e também com fatores de crescimento que contribuam para a fermentação e para as características sensoriais desejáveis.

Na literatura é possível encontrar variações na fabricação de hidromel em função do tipo de mel e aditivos utilizados na sua produção. Alguns exemplos de diferentes tipos de hidromel encontram-se apresentados na Tabela 3 (MILLER, 1994; BERRY, 2007).

Além da suplementação do mosto, outros fatores são importantes no desenvolvimento de um processo que permita a produção de hidromel de boa qualidade, com características sensoriais agradáveis e maior uniformidade do

produto final. Dentre estes fatores estão o tratamento do mosto e do produto final, além da seleção de leveduras que melhor se adaptem às características particulares do mosto de mel.

Tabela 3 - Classificação de diferentes tipos de hidromel quanto às matérias primas utilizadas (adaptado de Miller, 1994; Berry, 2007)

Hidromel Tradicional	Feito com mel, água e leveduras
Bracket ou Braggot	Hidromel feito com malte
Melomel	Hidromel feito com frutas, exceto maçã e uva
Metheglin	Hidromel adicionado de ervas e temperos
Cyzer	Hidromel feito com maçã ou suco de maçã
Pyment	Hidromel feito com uva, suco de uva ou concentrado de uva
Hippocras	É um Pyment temperado
Sack	É um hidromel com maior concentração de mel
Tej	Hidromel adicionado de casca de árvores, raízes e ervas

2.2.2.3 – *Tratamento do mosto de mel*

O tratamento térmico do mosto de mel é uma técnica que, apesar de constar na escassa literatura científica sobre a bebida, não apresenta parâmetros otimizados, sendo praticado de forma arbitrária.

Segundo Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005), a fervura do mosto de mel seguido de remoção dos coágulos formados é um tratamento que melhora a clarificação do produto final. No entanto, esta técnica resulta na perda de muitos dos atributos sensoriais do mel.

Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005) estudaram o efeito do tratamento térmico sobre a capacidade antioxidante e compostos voláteis do hidromel. Para tanto, o mosto de mel foi submetido a dois tratamentos térmicos diferentes, sendo um brando e outro mais severo. O tratamento brando consistiu em aquecer o mosto de mel (21°Brix) até 60°C e imediatamente imerso em banho de gelo por 30 minutos. O tratamento severo consistiu na fervura do mosto por 10 minutos e posteriormente

resfriado em banho de gelo por 30 minutos. Os autores concluíram que o aquecimento do mosto não alterou a capacidade antioxidante no hidromel. No entanto, foram observadas algumas alterações nos perfis de compostos fenólicos sendo que o aquecimento mais severo aumentou ligeiramente a concentração de compostos fenólicos totais, que pode ser justificada pela hidrólise dos respectivos ésteres.

O efeito do tratamento severo também influenciou na concentração de compostos voláteis no hidromel. Este tratamento resultou no aumento de concentração de acetato de isoamila, que é resultante do metabolismo de álcool isoamílico e acetil-CoA. Álcool isoamílico é produto da lise de aminoácidos e também um produto da reação de Maillard, gerado durante processos de aquecimento (MANCILLA-MARGALLI; LOPEZ, 2002).

Ukpabi (2006) avaliou o efeito de tratamento térmico do mosto de mel monofloral de mandioca (*Manihot esculenta*) visando à produção de hidromel. A pasteurização do mel (100°C/20min) foi seguida pela diluição e o mosto foi então mergulhado em água fervente por 20 minutos e resfriado. Este tratamento resultou na obtenção de hidromel com melhor conservação durante o período de estocagem.

O tratamento térmico também foi utilizado por outros autores como uma forma de tratamento do mosto de mel, conforme apresentado na Tabela 4, com diferentes condições de tempo e temperatura, no intuito de reduzir ou eliminar a carga microbiana natural do mel, de forma a não prejudicarem os objetos de estudos dos respectivos autores.

Tabela 4 - Diferentes condições de tratamento térmico aplicados em mosto de mel

Autores	Tratamento
Navrátil, Sturdík e Gemeiner (2001)	Esterilização do mosto (120°C/20 min)
Sroka e Tuszyński (2007)	Fervura do mosto por 10 min.
Mendes-Ferreira et al. (2010)	Pasteurização do mosto (65°/10min)

Além do tratamento térmico do mel e do mosto de mel, outras medidas sanitárias menos severas podem ser utilizadas para evitar o crescimento de microrganismos indesejados no mosto de mel. Um exemplo é a sulfitação, prática comum na produção de vinhos (GUERRA; BARNABÉ, 2005) que consiste em adicionar SO_2 ao mosto e que já foi utilizada com sucesso na produção de hidromel. Gupta e Sharma (2009) sugerem a adição de 100 ppm de SO_2 . Roldán et al. (2011) utilizaram 50 mg/L de metabissulfito de potássio para a sulfitação de mosto de mel, enquanto que Wintersten, Andrae e Engeseth (2005) utilizaram 100 ppm de metabissulfito de sódio para o mesmo fim.

Vidrih e Hribar (2007) adicionaram 25 mg/L de SO_2 após a fermentação do mosto de mel. Segundo os autores, a adição desse composto ao hidromel age na prevenção da oxidação da bebida, preservando seu aroma original.

A adição de ácidos orgânicos, tais como ácido tartárico e ácido cítrico, é comum nas formulações de mosto de mel. Além de equilibrar a acidez fixa da bebida final, estes ácidos também ajustam o pH do mosto, favorecendo o crescimento da levedura selecionada para o processo em detrimento de espécies de microrganismos indesejáveis (MORSE; STEINKRAUS, 1971).

Além do mel e do mosto de mel, Morse e Stenkraus (1971) sugerem a pasteurização do hidromel a 63°C por 5 minutos e o engarrafamento da bebida ainda quente como um tratamento alternativo para o produto final.

2.2.2.4 – Seleção de leveduras

As leveduras utilizadas na produção de hidromel geralmente são culturas *starters* utilizadas na produção de vinho, cerveja e espumantes. No entanto, o emprego de tais cepas gera insegurança, uma vez que não é certa a adaptação de tais leveduras devido as características peculiares do mosto de mel, tais como maior concentração de açúcares e menor concentração de nitrogênio (PEREIRA et al., 2009).

Segundo alguns autores, a utilização de leveduras comerciais que não se adaptam às condições do mosto de mel pode resultar em problemas conhecidos na

produção de vinho, como falta de uniformidade no produto final, refermentação pelas leveduras e metabolismo dos açúcares residuais por bactérias lácticas e acéticas, levando a mudanças negativas nas características sensoriais do produto final (PEREIRA et al., 2009, O'CONOR-COX; INGLEDEW, 1991).

Com o objetivo de se obter leveduras que melhor se adaptem às condições oferecidas pelo mosto de mel, alguns pesquisadores utilizam o mel e até mesmo hidroméis tradicionais como fonte de potenciais culturas *starters*.

Teramoto et al. (2005) isolaram a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ET99 do mel e estudaram suas características fermentativas comparando-a com as cepas de *S. cerevisiae* W4 e K7, utilizadas na produção de vinho e sakê, respectivamente. Ao final de oito dias de fermentação o hidromel produzido com *S. cerevisiae* ET99 apresentou características semelhantes às aquelas encontradas na bebida produzida com as linhagens *S. cerevisiae* W4 e K7, com propriedades aromáticas aceitáveis de acordo com análises sensoriais.

Pereira et al. (2009) avaliaram o desempenho fermentativo de 5 cepas de *S. cerevisiae* isoladas do mel tendo como controle uma cepa comercial (Premier cru) e outra de coleção de culturas (W303-1A). Os autores avaliaram o desempenho das leveduras tendo como critério de avaliação condições de estresse osmótico, resistência ao etanol e dióxido de enxofre. Os resultados não demonstraram qualquer diferença significativa no desempenho fermentativo das leveduras com base nos referidos critérios. Desta forma, sugeriram que a seleção de leveduras para a produção de hidromel deve levar em conta as características sensoriais do produto obtido principalmente no que se refere à produção de H₂S, compostos aromáticos e acidez volátil.

Mendes-Ferreira et al. (2010) analisaram o perfil de compostos que conferem aroma ao hidromel produzidos por diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Dentre 16 compostos identificados, verificaram que estes diferem apenas quantitativamente entre um hidromel e outro, demonstrando a contribuição da levedura utilizada para a diversidade de “bouquet” do hidromel.

2.2.2.5 – Processo fermentativo

Devido as elevadas concentrações de açúcares presentes no mosto de mel, a fermentação tende a ser lenta e requer cepas selecionadas de leveduras, bem como condições ótimas de pH, temperatura e outros fatores envolvidos no metabolismo das leveduras (RAMALHOSA et al., 2011). A lentidão da fermentação pelas cepas selecionadas poderia permitir o crescimento de bactérias produtoras de ácidos acético e láctico, resultando num aumento indesejado da acidez do mosto de mel durante a fermentação e também a produção de ésteres voláteis (CASELLAS, 2005) que alteram a qualidade sensorial do hidromel (RAMALHOSA et al, 2011).

Além da suplementação nutricional adequada e do tratamento térmico que pode ser dado ao mosto de mel (McCONNEL; SHRAMM, 1995, NAVRÁTIL et al., 2005), fatores como o emprego de uma cepa de levedura adequada em concentrações adequadas são relevantes na produção de hidromel.

Pereira et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de inóculo, variando entre 10^5 e 10^8 UFC/mL, sobre o perfil cinético da fermentação de mosto de mel. Os autores utilizaram duas cepas de leveduras *S. cerevisiae* e concluíram que, quanto maior o inóculo, menor o tempo de fermentação necessário para a estabilização da concentração de açúcares redutores. No entanto outras etapas do processo, como a clarificação do hidromel, se tornam mais complexas e dispendiosas.

Com relação às características físico-químicas dos hidroméis obtidos, Pereira et al. (2009) observaram que a concentração do inóculo não altera significativamente o pH, a acidez titulável e a concentração final de etanol. No entanto, a acidez volátil, expressa em ácido acético, aumentou significativamente com o aumento da concentração de inóculo, o que pode resultar na produção de *off flavours* que remetem a vinagre (MENDES-FERREIRA et al., 2010). Pereira et al. (2013) também observaram que a utilização de menores concentrações de inóculo resultaram em maiores concentrações de compostos que interferem no perfil aromático do hidromel, tais como álcoois superiores, ésteres, fenóis voláteis e ácidos graxos voláteis.

Barone (1994) utilizou 15,8g/L de fermento prensado para a produção de hidromel. Segundo o autor o produto final apresentou sabor e aroma de fermento acentuado e desagradável, encobrendo todas as demais características sensoriais do hidromel. O autor, após outros testes, sugeriu a utilização de fermento seco em concentrações entre 0,20 e 0,30 g/L.

Outro fator a ser considerado é o pH do mosto de mel. O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1 com um valor médio de 3,9 (IURLINA e FRITZ, 2005) e o mosto de mel apresenta baixo poder tamponante. O pH pode decrescer durante a fermentação a um ponto que limite a atividade das leveduras (RAMALHOSA et al., 2011).

Barone (1994), visando evitar possível contaminação bacteriana, adicionou ácido cítrico aos mostos de mel de forma a ajustar o pH para valores abaixo de 4,0. Durante as fermentações conduzidas, observou que, frequentemente o pH atingia valores abaixo de 2,2, inviabilizando a atividade das leveduras utilizadas na produção do hidromel.

Segundo Sroka e Tuszynski (2007), a redução do pH do mosto de mel pode ocorrer devido a síntese dos ácidos acético e succínico pelas próprias leveduras. Segundo os autores, mostos concentrados favorecem a produção de ácido acético pelas próprias leveduras, levando a um aumento na concentração de ácidos graxos não dissociados, que retardariam a fermentação alcoólica.

Visando minimizar a queda do pH a valores que comprometam a fermentação, alguns autores sugerem a utilização de agentes tamponantes na formulação do mosto de mel, a fim de manter o pH numa faixa entre 3,7 - 4,0 (McCONNEL; SHRAMM, 1995). Carbonato de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio e ácido tartárico estão entre os agentes tamponantes sugeridos (RAMALHOSA et al, 2011).

A temperatura de fermentação também deve ser um parâmetro a ser considerado. Gomes et al. (2013) avaliaram as interações entre diferentes concentrações de suplemento nutricional Enovit (variando entre 60 e 120 mg/L) e

temperaturas (variando entre 20°C e 30°C) na produção de hidromel. Os resultados demonstram que a temperatura não teve influência relevante na concentração final de etanol. Por outro lado, ocorreu um aumento na concentração de ácido acético quando se utilizou temperaturas superiores a 29°C e concentrações superiores a 90 mg/L. Desta forma, os autores demonstraram que temperatura de fermentação de 24°C e concentração de suplemento de 0,88 mg/L resultaram nos melhores resultados para os parâmetros avaliados – concentrações de etanol, glicerol, ácido acético, glicose e frutose.

Segundo Guerra e Barnabé (2005), temperaturas baixas permitem obter alto rendimento em álcool e menor perda por evaporação, além de interferir na natureza e quantidade de compostos secundários formados. Assim os ésteres responsáveis pelo aroma frutado são formados em maior quantidade em vinhos que fermentaram a temperaturas mais baixas (GUERRA; BARNABÉ, 2005), o que pode ser um fator positivo na produção de hidromel.

O emprego de células imobilizadas também foi avaliado, visando aumentar a taxa de fermentação e a produtividade do processo, além de reduzir as etapas e custos dos processos de *downstream*, como a filtração, por exemplo (NAVRÁTIL; STURDÍK; GEMEINER, 2001). Estudos sobre a produção de hidromel por processo contínuo foram realizados utilizando-se *S. cerevisiae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio (QURESHI; TAMHANE, 1985) ou pectato de cálcio (NAVRÁTIL; STURDÍK, GEMEINER, 2001), cujos resultados encontram-se reportados abaixo.

Qureshi e Tamhane (1985) estudaram a produção de hidromel em processo contínuo utilizando *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio e avaliaram diferentes condições de pH e temperatura do mosto e obtiveram uma produção estável de etanol numa faixa de pH entre 2,5-6,0 e temperatura na faixa de 18-30°C. A produção de hidromel seguiu por 3 meses, com menor incidência de contaminação e de fermentação secundária quando comparado com os processos fermentativos com células livres.

Navrátil, Sturdík e Gemenier (2001) estudaram a produção de hidromel em processo contínuo utilizando células imobilizadas em gel de pectato de cálcio em um

sistema com duas colunas. A produção de etanol se manteve em seu nível máximo por 60 h, quando se observou uma redução na velocidade da fermentação sendo que após 120 h, houve uma redução de 50% na produção do álcool, justificada pelos autores como resultado da inibição pelo etanol.

De acordo com Navrátil, Sturdík e Gemenier (2001), a principal vantagem no emprego de células imobilizadas na produção de hidromel seria a redução do custo de produção, uma vez que são empregadas grandes concentrações de células, favorecendo a taxa de fermentação e a redução do tempo necessário para produção do hidromel. No entanto, vale ressaltar que a condição, bem como a concentração, do inóculo podem influenciar na qualidade sensorial do hidromel.

2.2.2.6 – *Envelhecimento do hidromel*

A prática de envelhecimento de vinhos é comumente feita empregando-se tonéis de carvalho, devido às características morfológicas únicas do lenho desta madeira (GUERRA; BARNABÉ, 2005). Nesta etapa, a madeira permite a penetração lenta e contínua do oxigênio, que favorece as reações de condensação entre antocianinas e taninos, contribuindo para a estabilidade da cor, a diminuição da adstringência e o aumento da complexidade aromática do vinho. Assim a madeira é fonte de taninos elágicos, de substâncias aromáticas (GUERRA; BARNABÉ, 2005) e compostos fenólicos (MOSEDALE; PUECH, 1998), que são transferidos aos vinhos.

Segundo Bautista-Ortín et al. (2008), alguns dos compostos mais relevantes, no tocante ao ponto de vista sensorial, extraídos da madeira são as lactonas do carvalho (*cis* e *trans*- β -metil- γ -octalactonas), guaiacol, 4-metilguaiacol e vanilina, derivados da degradação da lignina durante a tostagem da madeira. Outros compostos com importantes características sensoriais são o furfural e 5-metilfurfural, resultantes da degradação da hemicelulose durante a tostagem (CUTZACH et al., 1999).

Apesar dos benefícios decorrentes do envelhecimento de bebidas em tonéis de madeira, estes são caros e não tem uma vida útil muito grande (BAUTISTA-

ORTÍN et al., 2008). Por isso, algumas alternativas têm sido estudadas para se obter os benefícios resultantes do processo de envelhecimento, tais como o uso de *chips* de carvalho (ÁLAMO et al., 2008; BAUTISTA-ORTÍN et al., 2008) bem como a reutilização dos tonéis (CERDÁN; AZPILICUETA, 2005).

Baltista-Ortín et al. (2008) avaliaram a utilização de *chips* de carvalho no envelhecimento de vinhos em tanques de inox, tonéis de carvalho usados e em tonéis novos. De acordo com os autores, ainda que os vinhos envelhecidos em tonéis novos apresentem melhores características sensoriais, o uso de chips de carvalho associado à utilização de tonéis usados que garantam boa sanidade microbiológica, pode ser uma alternativa viável para a produção de vinhos de boa qualidade.

Álamo et al. (2008) utilizaram ripas e chips de carvalho para envelhecimento de vinho e observaram que, para envelhecimento por períodos mais longos, as diferenças nas concentrações de extrativos da madeira são significativamente diferentes das encontradas em vinhos envelhecidos em tonéis novos.

Cérdan e Azpilicueta (2006) compararam o perfil de compostos que conferem aroma em vinhos quando estes foram envelhecidos em tonéis de carvalho novos e de segundo uso. Os autores observaram que o envelhecimento em toneis de segundo uso por períodos de 6 a 9 meses resultou em concentrações menores dos compostos da madeira quando comparados com tonéis novos. No entanto, o envelhecimento por 12-15 meses, devido a reações químicas e bioquímicas, resultou em vinhos similares em relação a concentração de extrativos da madeira.

Rivaldi et al. (2009) avaliaram as características sensoriais e a aceitabilidade de hidromel produzido sob as mesmas condições e armazenados em garrações de vidro e em tonel de carvalho. Os resultados revelaram que o envelhecimento em tonel de carvalho conferiu qualidades à bebida, que garantiram avaliações ligeiramente superiores nos atributos avaliados, quando comparados ao hidromel envelhecido em frasco de vidro.

2.2.4 – Capacidade Antioxidante do Hidromel

Estudos epidemiológicos correlacionam o consumo moderado de vinho com a redução de incidentes cardiovasculares em certas populações (KLATSKY, 1997). Originalmente, acreditava-se que o álcool era o responsável pelo benefício, devido a sua capacidade de aumentar os níveis séricos de colesterol HDL (*high density lipoproteins*), um composto associado com a redução dos riscos de doenças vasculares (GRAZIANO; BURING; BRESHOW, 1993). Segundo Serafini, Maiani e Ferro-Luzzi (1998) o consumo regular de fontes de compostos fenólicos, tal como o vinho e frutas, reduzem a incidência de acidentes cardiovasculares nos consumidores

Compostos fenólicos, flavonóides, ácido ascórbico, entre outros, são compostos conhecidos pela sua capacidade antioxidante, propriedade que combate o stress oxidativo causado por radicais livres derivados do metabolismo humano (URIZZI et al., 1999; HOLLMAN et al., 1997; KAPIOTIS et al. 1997). Além do vinho tinto, estes compostos são encontrados em grandes quantidades em frutas, vegetais e também no mel e hidromel (KOGUCHI; SAIGUSA; TERAMOTO, 2009; WINTERSTEEN; ANDRAE; ENGESETH, 2005; BERTONCELJ et al., 2007, FINOLA et al., 2007; STEINMETX; POTTER, 1996).

Devido ao potencial de ambos, vinho e mel, de prover efeitos protetores contra doenças associadas ao stress oxidativos, Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005) lançaram a hipótese de que o hidromel também proporcione tais benefícios. Os autores investigaram a ação antioxidante de diferentes tipos de hidromel e o efeito do aquecimento do mosto sobre tal efeito e observaram que a capacidade antioxidante do hidromel é comparável às do vinho branco. Ainda observaram que as bebidas avaliadas, um hidromel comercial e outro artesanal, apresentaram atividade antioxidante cerca de duas vezes superior a apresentada pelo vinho branco, mas aproximadamente três vezes menor do que a atividade apresentada pelo vinho tinto.

Koguchi, Saigusa e Teramoto (2009) adicionaram arroz preto (*Oryza sativa* var. *Indica*) ao mosto de mel visando obter hidromel com coloração mais avermelhada e com maior atividade antioxidante. Para efeito comparativo, os autores

também fizeram hidromel com a adição de arroz polido. Os autores observaram que a adição de arroz preto no mosto resultou em hidromel com maior concentração de compostos fenólicos e com atividade antioxidante superior ao hidromel produzido sem a adição de arroz preto. Por outro lado, o arroz preto afetou negativamente as características sensoriais dos produtos finais.

Considerando os benefícios para a saúde proporcionados pela ingestão moderada de vinho devido a sua atividade antioxidante, justifica-se a realização de pesquisas que visem a obtenção de hidromel com maior atividade antioxidante para que possa oferecer o mesmo benefício, como a utilização de frutas que possam, além de contribuir com as características físico-químicas e sensoriais, aumentem a concentração de elementos com atividade antioxidante no hidromel.

A utilização de maçãs na produção de hidromel é uma prática comum na produção de hidromel do tipo Cyser e pode ser uma alternativa interessante para incrementar a capacidade antioxidante do hidromel, uma vez que esta fruta é rica em compostos fenólicos e antocianinas (VIEIRA et al., 2011; D'ABROSCA et al. 2007).

Vieira et al. (2011) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavanol das cascas e das poupas de diferentes cultivares de maçãs. Também analisaram a capacidade antioxidante das cascas e polpas em separado. Os resultados mostraram que tanto os compostos fenólicos quanto os flavanóis estão mais concentrados nas cascas dos frutos que nas respectivas polpas. Assim, o emprego de maçãs como suplemento na produção de bebidas pode gerar produtos com considerável capacidade antioxidante.

Lobo et al. (2009) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante de 44 diferentes cidras, bebida alcoólica que utiliza a maçã como matéria prima. O conteúdo de compostos fenólicos totais variou entre 446 e 1180 mg/L tendo como padrão o ácido gálico. Estes resultados mostram que as cidras apresentam um conteúdo de compostos fenólicos superior ao encontrado em vinhos brancos. Como exemplo pode-se citar o vinho branco analisado por Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005), que apresentou um conteúdo de compostos fenólicos de 227,5 mg/L expressos como ácido gálico.

2.2.5 – Perfil e Teores de Aminoácidos Bioativos em Hidromel

Aminoácidos bioativos são compostos derivados da degradação enzimática de compostos nitrogenados e são naturalmente produzidas no organismo humano, sendo que as aminoácidos produzidas são fontes de nitrogênio e utilizadas como compostos precursores para síntese de hormônios, alcaloides, ácidos nucleicos e proteínas (GOMES et al., 2014; SANTOS, 1996).

Em alimentos, as aminoácidos bioativas se originam principalmente da descarboxilação dos aminoácidos por ação de microrganismos, como uma estratégia de sobrevivência em ambientes ácidos, ou como um suplemento alternativo de energia metabólica quando as células são expostas a condições desfavoráveis de disponibilidade de substrato (COTTER; HILL, 2003).

Muitas espécies bacterianas são capazes de descarboxilar aminoácidos como bactérias ácido-láticas que são capazes de produzir aminoácidos em vários alimentos, como queijo, carne fermentada, vegetais e bebidas (BOVER-CID; HOZAPFEL, 1999; MORENO-ARRIBAS; POLO; MUNOZ, 2003). Estas espécies podem ser empregadas como cultura *starter* na fabricação de uma série de alimentos fermentados, assim como podem ser consideradas como contaminantes em alguns processos.

Entre as principais aminoácidos bioativas encontradas em alimentos e bebidas são destacadas a histamina, a tiramina, putrescina e cadaverina (SANTOS, 1996). O consumo de produtos contendo quantidade significativa destas aminoácidos pode gerar quadros toxicológicos graves, como por exemplo o consumo da histamina, que age como um neurotransmissor e vasodilatador no sistema nervoso central e é considerada responsável por algumas manifestações alérgicas caracterizadas pela dificuldade de respirar, pruridos e erupções na pele, febre, vômito, e hipertensão (GOMES et al., 2014).

A tiramina, triptamina e a β -feniletilamina, têm sido associadas a crises hipertensivas. Por outro lado, a putrescina, espermina, espermidina e cadaverina, naturalmente presentes em alimentos, não foram associadas a efeitos adversos no

organismo humano, mas são precursoras das nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos (KALAC, 2009; SHALABY, 1996).

Segundo Gomes (2014), a presença de aminas bioativas em vinhos tem sido extensivamente estudada nos últimos anos em função de uma maior atenção dada a saúde do consumidor, sendo que mais de 20 diferentes aminas já foram identificadas em vinhos.

No vinho, os níveis de aminas bioativas são relativamente baixos no final da fermentação alcoólica, podendo aumentar durante a fermentação malolática e no envelhecimento, sugerindo que as bactérias ácido-láticas são as responsáveis por sua produção (FERRER; PEÑA-GALLEGO; HERNÁNDEZ-ORTE, 2011).

A variedade e as diferentes concentrações de aminas bioativas em vinho, podem ser explicadas pelas diferenças no processo de produção, tempo e condições de estocagem, qualidade da matéria prima e possíveis contaminações microbianas. As principais aminas encontradas em vinhos, e associadas como marcadoras de baixa qualidade, são a histamina, tiramina e putrescina (LONVAUD-FUNEL, 2001).

Devido aos problemas de saúde decorrentes do consumo de produtos com elevados teores de aminas bioativas em alguns países europeus foram estabelecidas recomendações quanto à quantidade máxima de histamina aceitável no vinho (2 mg/L na Alemanha, 6 mg/L na Bélgica, 8 mg/L na França e 12 mg/L na Suíça), o que causa impacto na exportação de vinho para esses países (GOMES, 2014).

Neste contexto, vale salientar que na literatura consultada, não foram encontradas informações sobre identificação ou quantificação de aminas bioativas em hidromel. Considerando que o processo de produção de hidromel se assemelha ao da vinificação e que as características do mosto de mel podem favorecer a produção de aminas bioativas, sugere-se o desenvolvimento de pesquisas no sentido de se investigar a formação destes compostos nas diferentes etapas de produção do hidromel.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Probióticos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

3.1 - Mel

O mel utilizado nesta pesquisa, classificado como mel silvestre, foi adquirido do Apiário Seiva das Flores, de São José do Rio Preto, São Paulo.

3.2 – Seleção e Avaliação do Desempenho de Leveduras

3.2.1 – Leveduras

Nesta etapa do trabalho 6 cepas de leveduras comerciais na forma liofilizada (Tabela 5) foram avaliadas quanto ao desempenho fermentativo e produção de sulfeto de hidrogênio.

Tabela 5 - Identificação das cepas de leveduras avaliadas

Identificação	Espécie	Marca
1	<i>S. cerevisiae</i>	Saflager W 34/70 – Fermentis
2	<i>S. cerevisiae</i>	Saflager S-23 – Fermentis
3	<i>S. bayanus</i>	Lalvin EC-1118 – Lalvin
4	<i>S. cerevisiae</i>	Pasteur Red – Red Star
5	<i>S. bayanus</i>	Pasteur Champagne – Red Star
6	<i>S. bayanus</i>	Premier Cuveé – Red Star

3.2.2 - Avaliação do desempenho fermentativo das leveduras em mosto de mel

O inóculo das respectivas cepas de leveduras foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD, composto por glicose (2%), extrato de levedura (0,5%) e peptona (1,0%), com pH ajustado para 4,5 pela adição de HCL 3M. Após autoclavagem a 111°C/15min, adicionou-se em cada frasco 0,1g de levedura seca seguido de incubação em incubadora de movimento orbital a 30°C, 200 rpm por 24 horas, após o que, foram caracterizadas quanto ao número de células.

Para o preparo do mosto, o mel foi diluído com água destilada para 30°Brix, suplementado com extrato de levedura (0,5% m/v) e peptona (1,0% m/v), pasteurizado (75°C/15 min) e distribuído assepticamente em tubos de ensaio. Cada tubo, contendo 10 mL de mosto, foi inoculado com aproximadamente 5×10^7 células/mL e incubado em estufa a 30°C.

O desempenho fermentativo foi avaliado por meio de coleta de amostras realizadas em duplicata, a cada 24h, por 72h para contagem de células e determinação das concentrações de açúcares redutores totais e etanol.

3.2.3 - Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S)

A produção de sulfeto de hidrogênio pelas respectivas cepas foi avaliada em conformidade com o teste proposto por Ono et al. (1991), em meio sólido, composto por peptona (0,3%), extrato de levedura (0,5%), glicose (4%), sulfato de amônio (0,02%), acetato de chumbo (0,1%) e ágar (2%), sendo autoclavado (111°C/10min) e distribuído em placas de Petri. As leveduras, recém ativadas em 20 mL de meio YEPD, a 30°C e 200 rpm por 24 h, foram semeadas nas placas e incubadas por 7 dias a 30°C, após o que foi observado o aparecimento de colônias enegrecidas, característica de produção do sulfeto de hidrogênio.

3.3 – Avaliação de formulações de mosto de mel

Nesta etapa foram avaliadas diferentes formulações de mosto de mel, verificando-se o efeito da suplementação com Sulfato de Amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$; Fosfato de Amônio Dibásico $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ e Cloreto de magnésio (MgCl_2) . Os ensaios foram realizados com base em um planejamento experimental completo 2^3 com repetição, em triplicata, no ponto central, tendo como respostas a produtividade volumétrica em etanol, rendimento e eficiência da fermentação. Os níveis de concentração dos respectivos sais (Tabela 6) foram definidos de acordo com as concentrações reportadas na literatura. Além destes avaliou-se o suplemento comercial Enovit, constituído de sulfato de amônio (70%), fosfato de amônio dibásico (19,8%), celulose (10%) e cloridrato de tiamina (0,20%) (AEB Bioquímica), na concentração de 0,6g/L, conforme utilizado por Gomes et al. (2010).

Tabela 6 - Matriz experimental para avaliação das formulações de mosto de mel

Experimento	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g/L)	MgCl_2 (g/L)
1	0,030	0,015	0,015
2	0,225	0,015	0,015
3	0,030	0,045	0,015
4	0,225	0,045	0,015
5	0,030	0,015	0,045
6	0,225	0,015	0,045
7	0,030	0,045	0,045
8	0,225	0,045	0,045
9	0,127	0,030	0,030
10	0,127	0,030	0,030
11	0,127	0,030	0,030

Para preparo do inóculo, a levedura selecionada na etapa anterior foi repicada sucessivamente em meio YEPMel contendo concentrações de mel crescentes (5%,

10%, 15%, 20% e 25%) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio incubados a 30°C por 24-48 horas, sob agitação de 200 rpm. A suspensão de células obtida foi caracterizada quanto à massa de leveduras (g/L), por turbidimetria.

Para elaboração do mosto, o mel foi diluído para 25°Brix em água destilada. Os respectivos sais foram adicionados ao mosto e o pH ajustado para 4,5 pela adição de NaOH 3M ou HCl 3M. O mosto devidamente suplementado foi pasteurizado em banho-maria a 75°C por 15 minutos, após o que foi adicionado de 50mg/L de metabissulfito de potássio.

Posteriormente, para avaliação das respectivas formulações, 150 mL de mosto foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL e inoculados com 1,5 g da cepa de levedura selecionada (1% m/v) seguido de incubação à temperatura ambiente ($20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sem agitação. Amostras foram coletadas a cada 48 h, durante a primeira semana e, posteriormente, coletadas semanalmente para determinação da concentração dos açúcares redutores, etanol e células. O processo foi interrompido quando a concentração de açúcares redutores atingiu valor igual ou inferior a 0,5 g/L.

3.4 - Produção de hidromel em escala piloto

Uma vez selecionada a cepa de levedura e a formulação do mosto determinada, realizou-se um experimento para avaliar a produção de hidromel em escala piloto.

Para tanto, foram utilizados três fermentadores de polipropileno com volume nominal de 150 litros (Figura 1), contendo 130 litros de mosto preparado pela diluição do mel em água mineral para se obter 20°Brix. Neste experimento avaliou-se o efeito da suplementação do mosto com a) 0,6 g/L do suplemento comercial Enovit, b) 13 Kg de maçãs do tipo Gala lavadas e cortadas em 8 partes e c) sem nutrientes (controle). Antes da inoculação, adicionou-se aos respectivos mostos 50mg/L de metabissulfito de potássio.

O respectivo inoculo foi preparado por meio do cultivo da cepa *S. bayanus* – (Pasteur Champagne – Red Star) em 4 frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 1L de meio YEPMel (previamente pasteurizado a 75°C por 15 minutos) formulado com 5% de mel. Os frascos foram incubados em shaker de movimento rotatório a 30°C, 200 rpm por 24 h, sendo que cada reator foi inoculado com 1,3 L (10% do volume total) de suspensão de células contendo 10^7 células/mL. Os reatores foram fechados e as mangueiras das válvulas de fermentação foram imersas em solução contendo 100 mg/L de metabissulfito de potássio (Figura 1) sendo a fermentação conduzida em câmara fria a temperatura de 18°C até estabilização da concentração de ART.

Figura 1 - Fermentadores utilizados para produção de hidromel em escala piloto

Fonte: Arquivo do autor.

Durante as primeiras 2 semanas de fermentação, amostras foram coletadas a cada 48 h, sendo que após este período, as coletas foram realizadas semanalmente para monitoramento da concentração de açúcares redutores totais, teor alcoólico e pH. Concluída a fermentação procedeu-se a trasfega sendo os respectivos meios fermentados submetidos ao processo de envelhecimento por 7 meses, conforme descrito no item 3.5.

3.5 - Envelhecimento do hidromel

Para avaliação do processo de envelhecimento dos hidroméis produzidos em escala piloto, o volume final de cada um dos reatores foi dividido em três partes e colocados em recipientes diferentes a saber: tonel de carvalho (50L), garrafão plástico (20L) e garrafão de vidro tipo bolha (25L), conforme ilustrado na Figura 2.

O processo de envelhecimento a 20°C durou sete meses e amostras de cada um dos recipientes foram coletadas a cada 45 dias para determinação do teor alcoólico, acidez fixa, volátil e total, açúcares redutores totais (ART) e extrato seco reduzido.

Ao final do processo de envelhecimento, os hidroméis obtidos foram conservados em garrafões de vidro, (4,7 L) fechados com rolha de cortiça e reservados para avaliação sensorial.

Figura 2 - Recipientes utilizados para envelhecimento do hidromel. Da esquerda para a direita: garrafão de vidro tipo bolha, garrafão de plástico, tonel de carvalho (recondicionado)

Fonte: Arquivo do autor.

3.6 - Parâmetros Fermentativos

3.6.1 - *Rendimento*

O fator de rendimento da fermentação alcoólica foi calculado a partir da equação (1):

$$Y_{P/S} = \Delta P / -\Delta S = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (1)$$

onde:

P_f : concentração final de etanol [g/L]

P_i : concentração inicial de etanol [g/L]

S_f : concentração final de açúcares [g/L]

S_i : concentração inicial de açúcares [g/L]

3.6.2 - *Eficiência da Fermentação ($\eta\%$)*

A eficiência de fermentação foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac e de acordo com a equação (2):

$$\eta(\%) = \left(\frac{Y_{P/S}^{obtido}}{Y_{P/S}^{teórico}} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde:

$Y_{p/s}$ teórico = 0,511 g/g

3.6.3 – *Produtividade Volumétrica em etanol*

A produtividade em etanol foi calculada conforme a equação (3):

$$Q_P = \frac{(P_f - P_i)}{t} = g / L \cdot h \quad (3)$$

Onde:

P_f : concentração final de etanol (g/L)

P_i : concentração inicial de etanol (g/L)

t: tempo de fermentação (h)

3.7 – Avaliação físico-química

Durante o período de envelhecimento dos hidroméis, amostras foram coletadas a cada 45 dias e foram caracterizadas quanto à graduação alcoólica (°GL), acidez total, acidez fixa e acidez volátil (meq/L), açúcares residuais totais (ART) e compostos fenólicos totais, bem como a atividade antioxidante.

As aminas bioativas foram caracterizadas nos hidroméis após o período de sete meses de envelhecimento.

3.8 - Métodos analíticos

3.8.1 - Concentração de células

A quantificação de células foi realizada por contagem em câmara de Neubauer.

3.8.2 – Determinação da concentração de dos açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores totais foi determinada de acordo com a metodologia do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme proposto por Miller (1959).

3.8.3 – Determinação da concentração de etanol, glicose e frutose

As concentrações de etanol, glicose e frutose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo WATERS (Milford, MA, EUA), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8mm) e detector de índice de refração. As amostras foram analisadas nas seguintes condições: temperatura de 45°C, eluente ácido sulfúrico 0,01N, fluxo 0,6 mL/min e volume de amostra 20µL.

3.8.4 - Análise dos compostos fenólicos totais

Para determinação da concentração dos compostos fenólicos totais foi empregada a metodologia proposta por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Para tanto, 0,5 mL da amostra devidamente diluída foi adicionada em tubo de ensaio contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (solução 10% de reagente de Folin-Ciocalteu em água destilada). A mistura obtida foi agitada e mantida em ambiente escuro por 3 minutos para reação, após o que 2 mL de solução 10% (m/v) de Na₂CO₃ foram adicionados em cada tubo e agitados. Após 15 minutos, o desenvolvimento de cor foi determinado pela medida de absorbância a 765 nm. A concentração de compostos fenólicos foi determinada utilizando-se uma curva de calibração tendo ácido gálico (0-400mg/L) como padrão. Os resultados foram expressos em mg/L de ácido gálico.

3.8.5 - Análise da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante do hidromel foi realizada pelo método de captura de radicais livres do composto 2,2 difenil- 1-picril-hidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Este método se baseia na redução do DPPH que, ao fixar um H⁺ (removido do componente antioxidante em estudo), acarreta em uma

diminuição da absorbância. Este processo consiste em adicionar a uma cubeta de espectrofotômetro 1,5 mL da solução metanólica de DPPH ($6 \times 10^{-5}\text{M}$) e uma alíquota de 0,5 mL da amostra de hidromel. As leituras foram realizadas a cada 3 minutos, em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm, até que fosse observada a estabilização da leitura, sendo esta utilizada para o cálculo da atividade antioxidante de acordo com a equação 4. As determinações foram realizadas em triplicata, tendo como controle a solução de DPPH ($6 \times 10^{-5}\text{M}$).

$$\text{Ativ. Antiox. (\%)} = (\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}) \times 100 / \text{Abscontrole} \quad (4)$$

3.8.6 - Determinação do pH

A determinação do pH das amostras foi realizada utilizando-se um pHmetro de bancada PG1800 GEHAKA.

3.8.7 – Acidez total

A acidez total foi determinada por meio de titulação de 10 mL da amostra com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,05 N padronizada e fenolftaleína como indicador, até coloração rósea persistente, conforme metodologia descrita em IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2004). A acidez total foi determinada pela equação (5):

$$\text{acidez em meq/L} = (n \times f \times N \times 1000) / V \quad (5)$$

onde:

n = volume em mL de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação subtraído do volume gasto na titulação de branco, feito com água destilada em substituição da amostra

f = fator de correção da concentração da solução de hidróxido de sódio

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V = volume da amostra

3.8.8 – Acidez volátil

A análise de acidez volátil foi adaptada da metodologia descrita em IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2004). Para tanto, 10 mL da amostra foram transferidos para um balão de fundo redondo contendo 250 mL de água destilada. A solução foi destilada até a obtenção de, no mínimo, 100 mL do destilado recolhido em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. Esta solução foi imediatamente titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,05 N, padronizada e fenolftaleína como indicador até coloração rósea persistente por 30 s. O cálculo da acidez volátil foi determinado pela equação (6):

$$\text{Acidez em meq/L} = (n \times f \times N \times 1000) / V \quad (6)$$

Onde:

n = volume em mL de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação subtraído do volume gasto na titulação de branco, feito com água destilada em substituição da amostra

f = fator de correção da concentração da solução de hidróxido de sódio

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V = volume da amostra

3.8.9 – Acidez fixa

A acidez fixa, expressa em meq/L, foi determinada pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil.

3.8.10 – Extrato Seco Reduzido

O extrato seco reduzido foi obtido pela subtração do valor de açúcares totais, quando este excede 1g/L, do valor do extrato seco total.

O extrato seco total foi obtido por adaptação do método descrito em IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2004). Para tanto, empregou-se cadinhos de porcelana previamente secos à 105°C por, pelo menos 24 h, resfriados em dessecador até atingir temperatura ambiente, sendo então pesados e tarados. Em seguida foram adicionados 20 mL de hidromel nos cadinhos e o conjunto foi novamente pesado. Assim, o conjunto foi colocado em estufa a 90°C até que o resíduo aparentasse aparência de seco, ou xaroposa. Então a temperatura da estufa foi elevada a 100°C por 1 hora, após o que os cadinhos foram resfriados em dessecador até a temperatura ambiente, sendo então pesados e levados novamente para a estufa a 100 °C. Este procedimento foi repetido até se obter peso constante. O extrato seco foi obtido pela equação (7):

$$\text{Extrato seco total (m/v)} = (1000 \times N)/V \quad (7)$$

sendo:

N = massa, em g, do resíduo

V = volume da amostra, em mL.

3.8.11 – Análise de compostos fenólicos e furânicos

A concentração destes compostos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity, utilizando a coluna Waters Spherisorb C18 5um ODS2 4,6 x 100 mm, sob as seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL e detector UV a 276 nm. As amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE). As respectivas concentrações foram determinadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão dos seguintes compostos: ácido gálico, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido furóico, vanilina, ácido ferrúlico, furfural, ácido vanílico, ácido sirínico e siringaldeído.

3.8.12 – *Análise de aminas bioativas*

O perfil e os teores das aminas bioativas presentes nos hidroméis foram determinados no Departamento de Ciências dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, segundo metodologia descrita por GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999).

As amostras foram filtradas em membrana HAWP em éster de celulose de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro do poro (Millipore, Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise por cromatografia líquida de alta eficiência por pareamento de íons em coluna de fase reversa, acoplado a detector de fluorescência após derivação com o-ftalaldeído (GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO, 1999).

3.9 - Avaliação Sensorial

A avaliação sensorial do hidrome envelhecido foi realizada nas instalações do Laboratório de Análise Sensorial da Planta Piloto de Bebidas do Departamento de Biotecnologia da EEL. Para tanto as amostras foram submetidas a teste de aceitação considerando os quesitos aparência, aroma, sabor, corpo e impressão global, além da atitude de compra.

Para a avaliação, alunos, professores e funcionários da EEL atuaram como julgadores. As amostras foram apresentadas aos julgadores em cabines individuais, codificadas com algarismos de três dígitos, em taças de acrílico transparente. Os provadores foram orientados a comer um pedaço de biscoito água e sal e tomar um pouco de água entre as amostras. Os julgadores avaliaram as amostras de hidromel preenchendo uma ficha (Figura 3) onde se observa uma escala hedônica estruturada, verbal, de 9 pontos, cujos resultados foram então submetidos à análise estatística por meio de ANOVA e teste t de Student, utilizando o software Excel 2013.

Para realização desta análise sensorial, o projeto foi submetido à avaliação de um comitê de ética e sua aprovação está registrada na Plataforma Brasil sob o

número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 23309813.9.0000.5431 (ANEXO A).

Figura 3 Ficha apresentada para análise sensorial

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra codificada da esquerda para a direita e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.

9 – gostei extremamente	Código da amostra: _____	_____	_____
8 – gostei muito	Notas:		
7 – gostei moderadamente	Impressão global: _____	_____	_____
6 – gostei ligeiramente	Cor: _____	_____	_____
5 – nem gostei / nem desgostei	Aroma: _____	_____	_____
4 - desgostei ligeiramente	Sabor: _____	_____	_____
3 – desgostei moderadamente	Aparência: _____	_____	_____
2 – desgostei muito			
1 – desgostei extremamente			

Assinale qual seria sua atitude quanto à compra do produto.	Código da amostra: _____	()
5 - eu certamente compraria este produto	_____	()
4 - eu provavelmente compraria este produto	_____	()
3 - eu tenho dúvidas se compraria ou não este produto	_____	()
2 - eu provavelmente não compraria este produto		
1 - eu certamente não compraria este produto		

Comentários: _____

Fonte: Arquivo do autor.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação do desempenho fermentativo de diferentes cepas de *S. cerevisiae* em mosto de mel

Devido ao o longo tempo demandado na produção de hidromel diversos problemas podem surgir, tais como atraso ou interrupção da fermentação; refermentação; aumento da acidez volátil; contaminação por bactérias; mudanças nas características sensoriais e falta de uniformidade do produto final (PEREIRA et al., 2009, SROKA; TUSZYNSKI, 2007, NAVRÁTIL; STURDIK; GEMEINER, 2011).

Experiências indicam que estes problemas podem estar associados com a cepa de levedura que não se adapta às condições desfavoráveis para seu metabolismo (BAUER; PRETORIUS, 2000, ATTFIELD, 1997). Diversos parâmetros podem ser considerados como fatores de estresse para leveduras durante a produção de hidromel, tais como temperatura, limitação de nutrientes essenciais, pressão osmótica e susceptibilidade à toxicidade ao etanol produzido (PEREIRA et al., 2009).

Pereira et al. (2009) avaliaram o desempenho de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, comerciais e outras isoladas do mel, sob diferentes condições de stress para a produção de hidromel. Os autores não observaram diferenças entre as cepas estudadas em relação ao stress osmótico, resistência a etanol e ao dióxido de enxofre. Baseados, então, nestes resultados, sugeriram que a seleção da levedura deveria levar em consideração as características sensoriais do produto final, além da baixa produção de sulfeto de hidrogênio e acidez volátil.

No presente trabalho foi avaliado o desempenho fermentativo de 6 cepas de leveduras comerciais visando à produção de hidromel. Para tanto, as leveduras foram inoculadas em mosto concentrado de mel (30°Brix) e a fermentação aconteceu à temperatura de 30°C por 72 horas. A Figura 4 apresenta o perfil cinético de cada cepa durante 72 horas de fermentação.

Observa-se que as cepas avaliadas apresentaram o perfil cinético semelhante durante a fermentação de mosto de mel no que tange ao consumo de açúcares e

Figura 4 Perfil cinético es diferentes cepas de leveduras na fermentação de meio YEP-Mel, sendo: -■- células ($\times 10^7$), -▲- açúcares redutores totais (g/L) e -♦- etanol (g/L). (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuveé)

Fonte: Arquivo do autor.

produção de etanol, mas diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) no que se refere ao crescimento celular.

Verifica-se ainda que com 72 horas de fermentação, as cepas Saflager S-23 (2), Pasteur Champagne (5) e Premier Cuveé (6) destacaram-se das demais atingindo produção de etanol de 83,2 g/L e 86,2 g/L, respectivamente. As concentrações de etanol alcançadas pelas demais cepas variaram de 73,4 g/L (Saflager W34/70) a 77,4 g/L (Premier Cuveé).

No tocante ao consumo de açúcares, observam-se variações entre 62,4% (Premier Cuveé - 6) e 69,7% (Saflager S-23 - 2) e que, com 48 horas de fermentação, há uma estabilização no consumo de açúcares pelas cepas Lalvin EC-1118 (3) e Premier Cuveé (6), apesar dos mostos, após 72 h de fermentação, ainda conterem 120,51 g/L e 130,00 g/L de açúcares, respectivamente. A presença destes açúcares residuais poderia então induzir a refermentação do hidromel não só pelas cepas selecionadas, mas também por bactérias lácticas e acéticas (PEREIRA et al., 2009). A ação destas bactérias aumenta a acidez volátil e leva à formação de ésteres que afetam a qualidade sensorial do produto final (O'CONOR-COX; INGLEDEW, 1991).

A redução na população das cepas Saflager S-23 (2) e Lalvin EC-1118 (3), bem como a existência de altas concentrações de açúcares residuais, são fatores que devem ser levados em consideração na seleção de cepas a serem empregadas na produção de hidromel, visto que os parâmetros cinéticos da fermentação estão relacionados à concentração de biomassa (HISS, 2001).

Além do perfil cinético, determinou-se também parâmetros fermentativos no que se refere ao rendimento, produtividade volumétrica e eficiência de fermentação, cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 5.

Em relação ao rendimento em etanol, verifica-se que a cepa *S. bayanus* Pasteur Champagne (5) destacou-se das demais, com rendimento de 0,43g/g, resultado superior ($p < 0,05$) aos obtidos com as demais cepas, que apresentaram rendimentos variando entre 0,29g/g e 0,33g/g. A cepa 5 também mostrou melhor desempenho na eficiência de conversão dos açúcares em etanol, apresentando 83,60% de eficiência contra uma média de 60,44% das demais cepas avaliadas.

Figura 5 - Rendimento, produtividade e eficiência em conversão dos açúcares em etanol pelas leveduras avaliadas (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuvéé)

Fonte: Arquivo do autor.

No presente trabalho, os parâmetros rendimento (0,43g/g) e eficiência de fermentação (83,6%) apresentados pela cepa *S. bayanus* Pasteur Champagne (5) foram ligeiramente superiores aos obtidos por Ilha et al. (2008). Estes autores

avaliaram os parâmetros fermentativos obtidos na produção de hidromel a partir de mosto de mel com 21°Brix inicial, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de fermento de panificação a uma concentração inicial de 4g/L e fermentação à temperatura ambiente. Os autores mantiveram o processo até a estabilização da concentração alcoólica, que ocorreu com 84 h, reportando valores de rendimento de 0,41g/g e a eficiência de fermentação de 81,27%.

A produtividade volumétrica é um parâmetro considerado importante por muitos pesquisadores (PEREIRA et al., 2009; SROKA; TUSZYNSKI, 2007; NAVRÁTIL; STURDIK; GEMEINER, 2011) e, no presente trabalho, a cepa *S. bayanus* Pasteur Champagne (5) foi a que apresentou o melhor resultado, com produtividade volumétrica em relação a etanol equivalente a 1,134g/L.h⁻¹.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5, as cepas avaliadas no presente trabalho apresentaram boa adaptação ao mosto de mel, sendo que a cepa *S. bayannus* Pasteur Campagne destacou-se em relação aos parâmetros fermentativos estudados quando comparada às demais cepas avaliadas. No entanto, convém ressaltar que a seleção de uma cepa de levedura para a produção de uma bebida alcoólica de qualidade não se limita a apenas a avaliação de seu desempenho fermentativo, mas também na sua capacidade de sintetizar compostos que contribuem para o perfil sensorial adequado da bebida.

4.2 - Avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

A baixa produção de sulfeto de hidrogênio durante a vinificação do mosto é uma das características que deve ser levada em conta na seleção de cepas para a produção de bebidas fermentadas (IRANZO; BRIONEZ-PÉREZ; IZQUIERDO-Cañas, 1998). Além de ser uma característica relacionada à atividade de enzimas sulfito-redutases produzidas pelas leveduras (GIUDICI; KUNKEE, 1994), as características nutricionais também influem na produção de sulfeto de hidrogênio (FLEET, 1993).

A concentração de nitrogênio no mosto é um dos principais fatores que influenciam na produção de sulfeto de hitrogênio no processo de produção de bebidas. A escassez deste nutriente interfere na atividade proteolítica das

leveduras, que passam a degradar proteínas e peptídeos que contenham enxofre em sua composição para a obtenção de nitrogênio, gerando o sulfeto de hidrogênio como subproduto dessa atividade proteolítica (FLEET, 1993).

As cepas de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de bebidas diferem entre si na produção do sulfeto de hidrogênio, de forma que aquelas superprodutoras de sulfeto de hidrogênio são indesejáveis para o processo fermentativo, pois a presença deste composto confere odor e sabor desagradáveis à bebida (RIBEIRO; HORII, 1999).

Geralmente, a avaliação de superprodução de sulfeto de hidrogênio é realizada por meio de métodos presuntivos relativamente rápidos e simples de serem realizados (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). No presente trabalho a produção de sulfeto de hidrogênio pelas cepas avaliadas foi realizada por meio de um teste proposto por Ono et al. (1991) e adaptado por Guimarães (2005).

A Figura 6 apresenta as imagens de cultivos das diferentes cepas de *S. cerevisiae* avaliadas neste trabalho em meio de Ágar LA, conforme descrito no item 3.2.3, cuja formação de sulfeto de chumbo confere a coloração enegrecida da colônia (ONO et al., 1991).

A produção de sulfeto de hidrogênio foi observada pela variação da intensidade da cor no perfil de pigmentação das colônias. A cor das colônias crescidas no meio contendo acetato de chumbo tende a ficar mais escura em resposta a maior produção de sulfeto de hidrogênio e consequente formação de sulfato de chumbo (ONO et al., 1991).

Observa-se ainda que as cepas avaliadas no presente trabalho apresentam diferenças quanto à produção de sulfeto de hidrogênio, sendo que as cepas Saflager W34/70, Lalvin EC-1118 e Pasteur Campagne formaram colônias com coloração visualmente mais intensa que as demais, com visível destaque para o cultivo da cepa *S. bayanus* Pasteur Champagne.

Guimarães (2005) utilizou o mesmo teste para selecionar cepas comerciais de leveduras para elaboração de vinho, levando em consideração as características de produção de sulfeto de hidrogênio. Como resposta classificou as referidas cepas como alta, média e baixa produtoras de sulfeto de hidrogênio, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 6 - Colônias de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio LA contendo acetado de chumbo (1-Saflager W 34/70; 2-Saflager S-23; 3-Lalvin EC-1118; 4-Pasteur Red; 5-Pasteur Champagne; 6-Premier Cuveé). Fonte: Flavio de Oliveira Ferraz.

Fonte: Arquivo do autor.

Em uma análise comparativa entre as colônias avaliadas no presente trabalho e as colônias classificadas por Guimarães (2005), verifica-se que

nenhuma das colônias apresentou coloração que pudesse classifica-las como superprodutoras de sulfeto de hidrogênio, sendo que a colônia de *S. bayanus* Pasteur Champagne, apresentou coloração mais escura entre as cepas avaliadas, podendo ser classificada como de média produção de sulfato de hidrogênio.

Considerando os resultados referentes ao desempenho fermentativo das cepas avaliadas em mosto de mel e produção de sulfeto de hidrogênio, produzido em quantidade insuficiente para conferir odor desagradável, optou-se por selecionar a cepa de *S. bayanus* - Pasteur Champagne para dar continuidade aos experimentos. Acrescenta-se ainda que esta opção foi reforçada pela produção satisfatória de compostos aromáticos, verificada por meio de testes subjetivos.

Figura 7 Características das colônias superprodutoras (A), medio produtoras (B), pouco produtoras (C) e não produtoras (D) de sulfeto de hidrogênio.

Fonte: Guimarães (2005)

4.3. Avaliação do desempenho fermentativo de *S. bayanus* (Pasteur Champagne – Red Star) em diferentes formulações de mosto de mel

Nesta etapa do trabalho foram avaliadas diferentes formulações de mosto de mel, verificando-se o efeito da suplementação com Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄); Fosfato de Amônio Dibásico ((NH₄)₂HPO₄) e Cloreto de magnésio

(MgCl₂). Os ensaios foram realizados em triplicata com base em um planejamento experimental completo 2³ com repetição do ponto central, conforme apresentado na Tabela 6 do item 3.3. Os resultados referentes aos parâmetros fermentativos avaliados neste experimento encontram-se apresentados na Tabela 7 e representados na Figura 9. Os níveis de concentração dos respectivos sais foram definidos de acordo com as concentrações encontradas na literatura consultada. Como referência utilizou-se o suplemento comercial Enovit (AEB Bioquímica), na concentração de 0,6g/L, conforme empregado por Gomes et al. (2010).

A Figura 8 apresenta os gráficos de Pareto dos efeitos principais e das interações de primeira ordem da suplementação do mosto com sais em diferentes concentrações tendo como resposta o rendimento em etanol, crescimento celular e concentração final de etanol.

A análise destes diagramas permite inferir que as diferentes formulações avaliadas não interferiram significativamente sobre o desempenho fermentativo da cepa *S. bayanus* tendo em vista que os parâmetros fermentativos estudados não diferiram entre si nas condições estudadas. Assim, verificou-se que as adições dos sais nas concentrações avaliadas não influenciaram significativamente no desempenho da cepa em estudo.

Os resultados apresentados na Tabela 7 demonstram que, de acordo com a análise estatística realizada pelo teste t de Student, com 95% de confiança, não houve diferença significativa em relação a suplementação do mosto sobre o consumo de açúcares. Também não foram observadas diferenças significativas na concentração final de etanol, com exceção do experimento 10, em que se obteve a menor concentração de etanol (46,42 g/L). Da mesma forma, com exceção do experimento 7, os demais não apresentaram diferenças significativas quanto ao crescimento celular.

Com relação aos parâmetros rendimento e eficiência, observa-se que os experimentos 8 e 10 apresentaram os menores resultados. Ambos apresentaram os valores de 0,222 g/g de rendimento em etanol e 43,4% de eficiência de fermentação. Nos demais experimentos foram obtidos rendimentos em etanol que variaram entre 0,246 g/g (experimento 1) e 0,273 g/g (experimento 2), correspondendo a valores de eficiência de fermentação de 48,1% e 53,4% respectivamente.

Figura 8 Gráfico de Pareto para análise dos efeitos dos suplementos sobre o rendimento em etanol (Yp/s) (A), crescimento celular (B) e concentração final de etanol (C).

A

B

C

Fonte: Arquivo do autor.

Tabela 7 - Parâmetros fermentativos referentes ao desenvolvimento de *S. bayanus* (Pasteur Champagne – Red Star) em mosto de mel suplementado com diferentes sais e nutriente comercial (*)

Experimentos	Crescimento Celular (%)	Consumo de açúcar (%)	Etanol (g/L)	Rendimento em etanol ($Y_{p/s}$)	Eficiência (%)
1	63,47 ^{ab}	84,44 ^a	56,41 ^{ab}	0,246	48,1
2	70,22 ^a	82,88 ^a	54,80 ^{ab}	0,273	53,4
3	67,89 ^{ab}	83,74 ^a	56,35 ^{ab}	0,262	51,3
4	63,64 ^{ab}	84,14 ^a	57,95 ^a	0,259	50,7
5	66,33 ^{ab}	83,94 ^a	55,09 ^{ab}	0,253	49,5
6	71,10 ^a	83,91 ^a	55,62 ^{ab}	0,254	49,7
7	54,98 ^b	83,92 ^a	57,48 ^a	0,265	51,9
8	66,45 ^{ab}	85,34 ^a	53,98 ^{ab}	0,222	43,4
9	71,88 ^a	83,43 ^a	56,80 ^{ab}	0,267	52,2
10	72,50 ^a	83,19 ^a	46,42 ^b	0,222	43,4
11	68,60 ^{ab}	83,39 ^a	52,34 ^{ab}	0,253	49,5
12 (*)	77,93 ^a	83,49 ^a	53,00 ^{ab}	0,261	51,1

Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

No tocante as cinéticas de consumo de açúcares e produção de etanol, referente aos experimentos delineados na Tabela 6 e apresentadas na Figura 9, verifica-se comportamento semelhante nas diferentes formulações de mosto avaliadas. Tal resultado demonstra a importância e as diferentes possibilidades de suplementação do mosto de mel com sais puros ou combinados, conforme encontrado em suplementos comerciais como Enovit.

Considerando os resultados obtidos nesta primeira etapa dos experimentos, observa-se que não houve diferença significativa entre as diferentes formulações de suplementação e o suplemento comercial Enovit quanto aos parâmetros avaliados. Assim, para a produção de hidromel em escala piloto, utilizou-se o suplemento comercial por questões práticas e econômicas, uma vez que o citado suplemento encontra-se facilmente no mercado sem a necessidade de mistura de compostos previamente.

Figura 9 – Perfil cinético dos experimentos realizados conforme planejamento experimental (Tabela 6), sendo: -■- etanol e -♦- açúcares redutores totais (ART)

Figura 9 – (Continuação) Perfil cinético dos experimentos realizados conforme planejamento experimental (Tabela 2), sendo: -■- etanol e -♦- açúcares redutores totais (ART)

Fonte: Arquivo do autor.

4.4 - Avaliação da produção de hidromel em escala piloto

Após a seleção da levedura e da formulação do mosto de mel, foi realizado um experimento para avaliar a produção de hidromel em escala piloto.

Conforme descrito no item 3.4, a produção do hidromel em escala piloto foi feita utilizando três fermentadores de polipropileno contendo 130 L de mosto de mel com diferentes suplementações a saber: Fermentador 1 – mosto sem suplementação (controle); Fermentador 2 – mosto suplementado com Enovit e Fermentador 3 – mosto suplementado com maçãs. Amostras foram retiradas a cada 48 horas durante as duas primeiras semanas de fermentação, após o que foram tomadas a cada 7 dias até a estabilização da concentração de açúcares redutores totais.

Os resultados referentes às variações da concentração dos açúcares redutores totais (ART), teor alcoólico e pH ao longo da fermentação estão apresentados na Figura 10. É possível observar que a suplementação do mosto de mel com Enovit resultou em fermentação mais rápida que os demais, com estabilização dos açúcares redutores totais em 13,96 g/L com 22 dias de fermentação. Verifica-se ainda que neste período os mostos controle e

suplementado com pedaços de maçãs ainda continham 50,00 g/L e 60,02 g/L de ART, respectivamente.

Figura 10 - Variação da concentração de ART (-▲-), teor alcoólico (-■-) e pH (-●-) durante a fermentação do mosto de mel Controle (A), suplementado com Enovit (B) e suplementado com maçã (C) em escala piloto

Fonte: Arquivo do autor.

O consumo de açúcares mais rápido observado quando o mosto foi suplementado com Enovit se deve ao aumento da disponibilidade de nitrogênio. Segundo Mendes-Ferreira et al. (2010), a concentração de nitrogênio no mosto de mel tem forte impacto sobre a atividade fermentativa das leveduras. Estes autores observaram que a fermentação alcoólica do mosto de mel foi mais rápida tanto quanto maior a concentração do suplemento diamônio fosfato.

Gomes et al. (2013) utilizaram o suplemento Enovit para aprimorar as condições de suplementação do mosto de mel, demonstrando que a utilização de 0,88g/L e temperatura de 24°C resultaram nas melhores condições para fermentação do mosto de mel, quando considerado consumo de açúcares, produção de etanol e ácido acético.

Devido à acidez do mel e a baixa capacidade tamponante do mosto de mel (MENDES-FERREIRA, 2010), o pH do mosto pode ser reduzido consideravelmente durante a fermentação. No presente trabalho, os valores do pH inicial do mosto controle e suplementados com Enovit e maçãs foram de 4,11, 4,40 e 4,17 respectivamente. Estes resultados demonstram que a adição de maçãs não alterou o pH natural do mosto de mel, mas a adição de Enovit provocou um pequeno aumento.

Verifica-se (Fig.10) que durante os primeiros 6 dias de fermentação, o pH dos mostos avaliados apresentou uma queda seguida de estabilização após este período, eliminando, desta forma, a necessidade de correção do pH durante a fermentação conforme sugerido por Barone (1994).

Com relação a variação do teor alcoólico durante a fermentação, observa-se (Tabela 8) que tanto a suplementação com Enovit quanto com pedaços de maçãs foi suficiente para obtenção de teor alcoólico significativamente ($p < 0,05$) mais elevado que o mosto controle.

Além dos efeitos positivos sobre a taxa de consumo de açúcares e formação de etanol no hidromel, a presença de nitrogênio no Enovit, bem como na maçã, promove alterações na produção de compostos de aroma pelas leveduras. Mendes-Ferreira (2010), reportou que a adição de diamônio fosfato ao mosto de mel resultou em maiores concentrações de compostos de aroma, tais como ácidos graxos e alguns ésteres, e também estimulou a síntese de acetato de etila, composto que confere um odor que remete a solvente. Assim, ao selecionar um nutriente para suplementar o mosto de mel deve-se considerar, além dos seus efeitos sobre o desempenho da levedura, a sua influência sobre as características físico-químicas e sensoriais da bebida.

Após 56 dias de fermentação, tempo necessário para estabilização da concentração de ART, o hidromel obtido a partir das diferentes formulações de mosto avaliadas foi caracterizado quanto aos parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade de hidromel, conforme preconizados na Portaria 64, Anexo III do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA (BRASIL, 2008), cujos resultado são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade do hidromel produzido em escala piloto

Parâmetro	Formulações do Mosto			Valores da Portaria 64 de 2008 (BRASIL 2008)
	Controle	Enovit	Maçã	
Teor alcoólico (% v/v, 20°C)	8,9 ± 0,1 ^a	9,6 ± 0,2 ^b	9,6 ± 0,1 ^b	De 4,0 a 14,0 % (v/v, 20°C)
Acidez volátil (meq./L)	5,21 ± 0,13 ^a	3,17 ± 0,12 ^b	4,83 ± 0,09 ^c	Máximo de 20 meq./L
Acidez fixa* (meq/L)	27,66	30,90	35,57	Mínimo de 30 meq./L
Acidez total (meq/L)	32,87 ± 0,60 ^a	34,08 ± 0,36 ^b	40,40 ± 0,51 ^c	De 50 a 130 meq./L
ART residual (g/L)	9,36 ± 0,23 ^a	11,74 ± 0,08 ^b	5,91 ± 0,09 ^c	-
Extrato seco reduzido (g/L)	20,24±0,17 ^a	26,34±0,21 ^b	19,29±0,12 ^c	Mínimo de 7g/L

*Valor determinado pela diferença entre Acidez total e Acidez volátil. Médias com as mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

De acordo com os valores de referência preconizados pela referida portaria, observa-se que apenas os valores de acidez fixa para o hidromel controle e acidez total para o hidromel obtido a partir das formulações estudadas não estão em conformidade.

A acidez total do mosto leva em conta todo tipo de ácidos, tais como aminoácidos e ácidos inorgânicos como o ácido fosfórico, ácidos orgânicos como ácidos succínico e láctico, que são produzidos por bactérias e leveduras (RIBÉREAU-GAYON, 2006). Assim, tanto a composição do mel utilizado bem como a ação de leveduras e bactérias sobre o mosto influenciarão na acidez total do produto final.

Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005) avaliaram as características físico-químicas de diferentes tipos de hidromel e constataram que a acidez total variou com o tipo de mel utilizado, bem como com as práticas de produção. Os resultados mostraram que a acidez do hidromel variou entre 14,07 meq/L e 39,53 meq/L para hidromel artesanal e hidromel experimental, respectivamente, ambos produzidos com mel de flor de soja, enquanto que o hidromel produzido a partir de mel de flor de trigo, nas mesmas condições, apresentou acidez de 19,90 meq/L.

A adição de ácidos orgânicos ao mosto de mel pode ser uma alternativa tecnológica para o ajuste da acidez total do hidromel. Mendes-Ferreira et al. (2010) avaliaram o efeito da adição de ácido málico e tartarato de potássio ao mosto de mel e verificaram que a adição de 5 g/L de tartarato de potássio e 3 g/L de ácido málico ao mosto de mel resultou num aumento de 136,7% na acidez total, passando de 20,1 meq/L (controle) para 47,57 meq/L no mosto suplementado.

A adição de frutas na forma de suco ou *in natura* também pode contribuir na acidez total do hidromel para os níveis exigidos por lei. No presente trabalho, a suplementação do mosto de mel com maçãs resultou em um hidromel com acidez total 23% superior ao mosto não suplementado (Controle). Estes resultados se devem a acidez intrínseca da fruta utilizada. Rizon, Bernardi e Miele (2005) analisaram as características físico-químicas de sucos de maçãs de diferentes

cultivares e encontraram concentrações de acidez total variando entre 48,3 meq/L e 49,4 meq/L para a cultivar Gala, a mesma utilizada neste trabalho. Os autores pesquisaram também a concentração de ácido málico nos sucos e, para esta cultivar, foram encontradas concentrações entre 4,0 g/L e 4,1 g/L. O ácido málico é precursor da fermentação malolática, processo que pode influenciar nas características sensoriais da bebida (FLEET, 1993).

Com relação a acidez fixa (Tabela 8) verifica-se que, apenas o hidromel obtido do mosto sem suplementação (27,66 meq/L) não atingiu o mínimo de 30 meq/L estabelecido nos padrões de identidade e qualidade. O hidromel cujo mosto foi suplementado com Enovit (30,90 meq/L) e com maçã (35,57 meq/L), superaram ligeiramente os valores estabelecidos na legislação.

Com relação à acidez volátil, verifica-se os hidroméis obtidos apresentaram valores dentro dos limites preconizados pela legislação, variando entre 3,17 meq/L e 5,21 meq/L. Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005) reportaram valores de acidez volátil entre 7,99 meq/L (mel de flor de trigo) e 21,64 meq/L (mel de flor de soja). Mendes-Ferreira et al. (2010) obtiveram valores de acidez volátil variando entre 8,49 meq/L e 13,98 meq/L para hidromel produzido com a mesma matéria prima, mas variando a suplementação do mosto.

A baixa acidez volátil é uma consequência do grau de higiene do processo produtivo, uma vez que os ácidos responsáveis pela acidez volátil (acético, fórmico, butírico e propiônico) são derivados, geralmente, de contaminação bacteriana (BARNABÉ, 2006).

Dentre os fatores que influenciam a produção de ácidos orgânicos destaca-se as condições ambientais que podem alterar a acidez volátil do hidromel. Segundo Gomes et al. (2011 b), temperaturas acima de 25°C e uma concentração de Enovit variando entre 72 e 120 mg/L podem resultar num incremento relevante na concentração de ácido acético. Estes autores reportaram concentração de ácido acético 0,8g/L o que representa cerca de 13,32 meq/L de acidez volátil. Os autores reforçam ainda que a fermentação em temperaturas acima de 29°C, nas

mesmas condições de suplementação, poderia resultar em concentração de ácido acético superior a 13,32 meq/L.

Segundo Sroka e Tuszynski (2007) a concentração de ácido acético aumenta significativamente durante a fermentação alcoólica de mostos muito concentrado. Isto porque quando a levedura é sujeita a estresse osmótico, a conversão de acetaldeído a etanol é reduzida, o que resulta na síntese de maior quantidade de ácido acético (ERASMUS; MERWE; VUUREN, 2003).

Com relação ao teor alcoólico nos diferentes tipos de hidromel, observa-se que a suplementação com maçã foi tão eficiente quanto a suplementação com Enovit favorecendo a obtenção significativamente superior ($p < 0,05$) em relação ao hidromel controle, correspondendo a 8,9%.

Segundo Gomes et al. (2013), a concentração final de etanol está correlacionada com a temperatura de fermentação e suplementação do mosto. Ao fermentar um mosto de mel (395g de mel/L), a maior concentração de etanol (124,0 g/L) foi obtida controlando-se a temperatura em 25°C e suplementando o mosto com 90 mg/L de Enovit.

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) também foram observadas (Tabela 8) no que se refere a concentração de açúcares redutores residuais, sendo que a suplementação com Enovit promoveu uma maior eficiência na conversão dos açúcares em álcoois, conferindo ao hidromel a menor concentração de ART e concentração alcoólica (9,6%) semelhante ao hidromel obtido de mosto suplementado com maçã.

Segundo Gomes et al. (2013), concentração elevada de açúcares residuais pode permitir a refermentação do hidromel, promovendo aumento da acidez volátil e prejudicando as características sensoriais do produto final. Vale salientar que os autores descartaram um hidromel cuja concentração de açúcares residuais foi de 32,7 g/L, valor menor que os encontrados no presente trabalho.

O extrato seco é um parâmetro que está relacionado com a estrutura e o corpo de bebidas alcoólicas (RIZZON; MIELE, 1996). O extrato seco reduzido corresponde ao extrato seco total subtraído dos açúcares residuais e, no presente trabalho, apesar das diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores de extrato seco reduzido (ESR) reportados na Tabela 8, ressalta-se que os mesmos se encontram dentro da faixa de referência preconizada pela legislação. Os diferentes hidroméis obtidos apresentaram valores de ESR de 20,24 g/L, 26,34 g/L e 19,29 g/L para o mosto controle e quando suplementado com Enovit e maçã, respectivamente.

4.5 Perfil e quantificação de aminos bioativas no hidromel

Aminas bioativas são bases orgânicas com atividade biológica produzidas por microrganismos empregados na fermentação de alimentos e bebidas e podem causar graves efeitos toxicológicos no organismo humano. (GOMES et al., 2014).

Nos últimos anos, a presença de aminos bioativas vem sendo pesquisada em bebidas tais como cerveja e vinho, onde são formadas por ação de bactérias ácido-láticas durante a fermentação ou envelhecimento das bebidas, ou estão presentes nas matérias primas utilizadas na produção (GOMES et al., 2014).

Os resultados apresentados na Tabela 9 revelam que, terminada a fermentação, dentre as aminos bioativas investigadas apenas espermidina, feniletilamina e espermina foram identificadas em baixas concentrações no hidromel produzido a partir de mosto de mel suplementado com Enovit, assim como espermina quando este foi suplementado com maçã.

Segundo Larqué et al. (2007) a espermidina, juntamente com a putrescina e agmatina, fazem parte do grupo das poliaminas que é parte fundamental em qualquer tecido vivo. As poliaminas como a putrescina, espermina, espermidina e cadaverina estão naturalmente presentes em alimentos, resultantes do crescimento e da proliferação de microrganismos, porém, não estão associadas a efeitos adversos no organismo humano. Por outro lado, podem ser consideradas como

precursor mutagênico uma vez que podem reagir com o nitrito formando nitrosaminas carcinogênicas (GOMES et al., 2014).

Tabela 9 - Aminas bioativa ($\mu\text{g/mL}$) presentes nos hidromeis após fermentação em escala piloto

Aminas Bioativas	Controle	Enovit	Maçã
Putrecina	ND*	ND	ND
Cadaverina	ND	ND	ND
Histamina	ND	ND	ND
Tiramina	ND	ND	ND
Serotonina	ND	ND	ND
Agmatina	ND	ND	ND
Espermidina	ND	0,29	ND
Feniletilamina	ND	0,76	ND
Espermina	ND	1,09	0,28
Triptamina	ND	ND	ND

* ND - Não Detectado

Ao analisar 25 tipos de cervejas, Botelho (2009) detectou espermidina em 12 delas em concentrações não superiores a $0,7 \mu\text{g/mL}$.

Mota et al. (2009) analisou a presença de aminas bioativas em quatro cultivares distintos de uva do tipo Syrah e encontrou concentrações de espermidina variando entre $0,08 \mu\text{g/mL}$ e $0,89 \mu\text{g/mL}$.

A feniletilamina é uma das aminas biogênicas formadas pela ação de descarboxilação de aminoácidos por enzimas microbianas e tem sido associada a crises hipertensivas, resultando em aumento da pressão sanguínea podendo levar a falhas no coração ou até mesmo a hemorragia cerebral (GOMES et al., 2014). Apesar disso, no Brasil há apenas uma legislação sobre concentrações máximas permitidas de histamina e esta se refere a pescados frescos e seus derivados (BRASIL, 1997). De acordo com Gomes et al. (2014), também na União Européia e nos Estados Unidos, as poucas regulamentações existentes também tratam apenas das concentrações de histamina em alimentos, com limites variando entre 100mg/Kg para pescado fresco e 400mg/Kg para produtos curados.

Em alguns países da Europa existem recomendações estabelecendo como quantidade máxima de histamina aceitável em vinhos de 2mg/L sendo

especificamente na Alemanha 5-6 mg/L na Bélgica e França 8mg/l e 12mg/L na Suíça (SMIT; DU TOIT; DU TOIT, 2009).

Considerando o perfil e as baixas concentrações de aminas identificadas nos diferentes tipos de hidromel infere-se que as condições do processo utilizadas foram adequadas não trazendo riscos à saúde do consumidor.

4.6. Avaliação dos parâmetros físico-químicos do hidromel durante o envelhecimento

As características físico químicas e sensoriais do hidromel dependem de uma série de fatores que incluem o tipo de mel, a levedura empregada como agente da fermentação, a formulação do mosto e o processo de envelhecimento. Neste contexto vale destacar que fatores como tempo de envelhecimento, condições ambientais, volume do tonel, tipo de madeira, volume e estado de conservação do tonel, influenciam notadamente as características físico químicas e sensoriais do hidromel.

Desta forma, os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos do hidromel obtido no presente trabalho e envelhecidos sob as mesmas condições e em diferentes tipos de recipiente encontram-se representados na Figura 11.

Observa-se valores de teor alcoólico crescentes ao longo do envelhecimento para os diferentes tipos de recipientes avaliados tendo como consequência redução na concentração de açúcares redutores totais (ART). Desta forma, conclui-se que a fermentação alcoólica continuou após a trasfega do hidromel para os recipientes de envelhecimento.

Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Fernandes, Locatelli e Scartazzini (2009), que armazenaram hidromel em garrafas de vidro por um ano e também observaram aumento na graduação alcoólica e redução na concentração de açúcares residuais.

Os valores de acidez volátil apresentaram reduções que variaram entre 3,8% (fermentado suplementado com Enovit, envelhecido em tonel) e 52,6%

(fermentado suplementado com maçãs, envelhecido em tonel) durante o processo de envelhecimento com exceção para o hidromel obtido do mosto suplementado com Enovit. Este resultado se deve provavelmente a atividade metabólica das leveduras presentes e ainda ativas durante o processo de envelhecimento. Vilela-Moura et al. (2008) demonstraram que cepas comerciais de *S. cerevisiae* podem, em 72 horas, reduzir em 40% a acidez volátil de vinhos ácidos que apresentam baixa concentração de glicose (cerca de 3% m/v) e alta concentração de etanol (cerca de 10% v/v).

A acidez total dos diferentes tipos de hidromel e submetidos ao envelhecimento em tonel de carvalho apresentaram incrementos de 2,7%, 12,3% e 17,6% para os mostos de mel sem suplementação (controle) e suplementados com Enovit e maçã, respectivamente. Os hidroméis obtidos a partir do mosto controle e suplementado com Enovit e envelhecido em recipiente de vidro por 216 dias, apresentaram incrementos nos valores de acidez total correspondentes a 6,8%, 2,32%, respectivamente, enquanto o hidromel produzido com mosto suplementado com maçã apresentou ligeiro decréscimo de 0,2%. Salienta-se que nenhum dos hidroméis atingiu o valor mínimo estabelecido na legislação que é de 50meq/L. Por outro lado, quando o hidromel foi envelhecido em frascos plásticos observou-se incrementos da acidez total na ordem de 8,2%, 16,0% e 13,4% para o mosto controle, suplementado com Enovit e com maçã, respectivamente.

Segundo Ribéreau-Gayon (2006), a continuidade do processo fermentativo durante o período de envelhecimento pode resultar na formação de ácidos orgânicos não voláteis, como por exemplo o ácido succínico, derivado do metabolismo celular das leveduras e que, em vinhos, pode alcançar concentrações de cerca de 1g/L. Esta observação pode justificar o incremento da acidez total dos hidroméis submetidos ao processo de envelhecimento no presente trabalho.

Ainda que tenha ocorrido aumento nos valores de acidez total, o mesmo não foi suficiente para conferir aos hidroméis os valores mínimos preconizados pela legislação (BRASIL, 2008). Neste contexto, vale destacar que o hidromel

produzido a partir do mosto suplementado com maçã foi o que apresentou valor de acidez total próximo ao estabelecido nos padrões. Desta forma, fica evidenciado que a adição de frutas ou seus derivados é uma alternativa para ajustar este parâmetro em conformidade com as exigências da legislação.

No tocante ao parâmetro acidez fixa, observa-se que os hidroméis produzidos a partir do mosto sem suplementação (controle) e suplementados com Enovit e maçã, quando envelhecidos em tonéis de carvalho, apresentaram valores de acidez fixa de 11,5%, 13,8% e 23,9%, respectivamente. Reduções nas concentrações de acidez fixa também foram observadas nos fermentados envelhecidos em recipientes de plástico (16,2%, 18,8% e 13,4%) e frasco de vidro (16,1%, 2,2% e 3,9%).

Observa-se (Figura 11) que a concentração dos açúcares redutores totais (ART) foi reduzida significativamente ($p < 0,05$), independentemente do recipiente de envelhecimento e da formulação do mosto, com exceção do fermentado suplementado com Enovit e envelhecido em recipiente de plástico. Neste, não foi observada redução na mesma ordem de concentração de ART dos demais fermentados.

Considerando as concentrações residuais de ART ao longo do envelhecimento dos fermentados, observa-se que estas concentrações corroboram com as condições de meio fermentado descrita por Vilela-Moura et al. (2008), em que são necessários 3% (m/v) de glicose para que cepas de *S. cerevisiae* possam manter seu metabolismo durante o envelhecimento em vinhos contendo teor alcoólico de 10% (v/v). Segundo os autores, este metabolismo provoca a redução da acidez volátil ao longo do envelhecimento dos fermentados, principalmente pelo consumo de ácido acético. Esta redução da acidez volátil também foi observada nos fermentados envelhecidos do presente trabalho.

Figura 11 - Variação dos parâmetros físico-químicos dos hidroméis durante o envelhecimento em tonel de carvalho, frasco plástico e garrafão de vidro onde 1 – mosto controle; 2- mosto suplementado com Enovit e 3- mosto suplementado com maçã

Fonte: Arquivo do autor.

(continua)

Figura 11 – (conclusão) Variação dos parâmetros físico-químicos dos hidroméis durante o envelhecimento em tonel de carvalho, frasco plástico e garrafão de vidro onde 1 – mosto controle; 2- mosto suplementado com Enovit e 3- mosto suplementado com maçã.

Fonte: Arquivo do autor

Nota-se também que os valores de extrato seco reduzido são decrescentes para os hidromeis obtidos das diferentes formulações de mosto e envelhecidos nos diferentes recipientes. Nos hidromeis obtidos do mosto controle e enriquecido com Enovit e envelhecidos em frasco de plástico esta redução foi suficiente para alcançar valores de extrato seco reduzido inferiores a 7g/L, valor mínimo estabelecido na legislação (BRASIL, 2008), descaracterizando o produto final quanto aos parâmetros de identidade e qualidade do hidromel.

4.7. Evolução da concentração dos compostos fenólicos durante o envelhecimento do hidromel

Os compostos fenólicos têm um importante papel na enologia e apresentam propriedades que são responsáveis pela prevenção contra doenças cardiovasculares, além de agirem como bactericidas e antioxidantes (RIBÉREAU-GAYON, 2006). Compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e taninos, possuem reconhecida atividade antioxidante (URIZZI et al., 1999) e são responsáveis pelo combate ao estresse oxidativo (WINTERSTEEN; ANDRAE; ENGESETH, 2005).

A evolução da concentração de compostos fenólicos totais nos diferentes tipos de hidromel envelhecidos por 216 dias é apresentada na Tabela 10 e na Figura 12. É possível observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na maioria dos hidroméis durante o período de envelhecimento.

O envelhecimento em tonéis de carvalho conferiu aos hidroméis produzidos com mosto controle e suplementado com Enovit aumentos de 8,5% e 13,3%, respectivamente, nas concentrações de compostos fenólicos totais, enquanto que no fermentado produzido com mosto suplementado com maçã foi observada uma ligeira redução de 1,1% na concentração de fenólicos totais.

Quando envelhecidos em recipientes de vidro, novamente foram observados aumentos na concentração de compostos fenólicos totais nos fermentados produzidos

com mosto controle e suplementado com enovit (4,8% e 3,1%, respectivamente), enquanto no fermentado obtido com mosto suplementado com maçã houve decréscimo de 2,2% na concentração de fenólicos totais.

Tabela 10 - Concentrações de Compostos Fenólicos Totais (mg/L ácido gálico) nos diferentes tipos de hidromel envelhecidos por 216 dias, em diferentes recipientes, onde: 1 – mosto controle; 2 – mosto suplementado com Enovit; 3 – mosto suplementado com maçã;

Recipiente	Tempo de envelhecimento (dias)					
	Inicial	45	90	135	180	216
Tonel 1	201,09 ^a	215,17 ^b	215,25 ^b	217,03 ^b	221,17 ^c	219,84 ^{bc}
Tonel 2	203,23 ^a	226,54 ^b	232,40 ^b	233,08 ^{bc}	236,09 ^c	234,40 ^{bc}
Tonel 3	285,12 ^a	284,22 ^a	283,85 ^{ab}	282,59 ^b	277,78 ^c	282,05 ^b
Vidro 1	201, 09 ^a	201,80 ^a	221,20 ^b	210,98 ^c	206,93 ^d	211,34 ^c
Vidro 2	203, 23 ^a	195,54 ^b	215,95 ^c	213,58 ^c	204,71 ^a	209,60 ^d
Vidro 3	285, 12 ^a	277,29 ^b	297,85 ^c	282,56 ^a	266,81 ^d	278,78 ^b
Plástico 1	201, 09 ^a	205,02 ^b	198,80 ^a	236,58 ^c	222,39 ^d	227,03 ^e
Plástico 2	203, 23 ^a	213,71 ^b	202,30 ^a	230,57 ^c	227,13 ^d	227,57 ^d
Plástico 3	285, 12 ^a	283,22 ^a	258,30 ^b	306,62 ^c	297,96 ^d	301,09 ^e

Médias com as mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

Nos hidromeis envelhecidos em recipientes de plástico, foram observados aumentos nos três fermentados produzidos, sendo este aumento de 11,4%, 10,7% e 5,3% nos fermentados controle, suplementado com Enovit e suplementado com maçãs, respectivamente.

Lima (2012) observou aumento na concentração de compostos fenólicos totais em vinhos brancos armazenados em garrafas de vidro por 10 meses. Segundo o autor, as alterações observadas podem ser atribuídas às constantes reações de polimerização, condensação e hidrólise que ocorrem entre os compostos durante o envelhecimento, sendo que a redução na concentração de alguns componentes pode ocorrer devido à formação de novos compostos, que podem dar origem a diversos compostos monoméricos.

De acordo com os resultados apresentados, é possível notar que variações nas concentrações de compostos fenólicos totais ao longo do envelhecimento ocorreram independente do recipiente utilizado. No entanto, é possível observar que há uma diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de fenólicos totais do

hidromel produzido com mosto suplementado com maçã, quando comparado aos demais, devido a extração destes compostos da fruta.

Na maçã os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (97%), sendo que, nas células do epicarpo e subepicarpo, as suas concentrações são superiores às encontradas nos tecidos internos da fruta (NICOLAS et al., 1994) e estão relacionados com a pigmentação da fruta. Esta pigmentação está relacionada ao cultivar e à biossíntese de antocianinas em presença de luz e favorece a aparência da fruta tornando-a atrativa, sendo que outros compostos fenólicos contribuem de forma significativa com a sensação de amargor e adstringência (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002) e na formação de aromas na fruta e seus derivados (LEA; DRILLEAU, 2003).

Figura 12 - Variação da concentração de compostos fenólicos totais ao longo do envelhecimento dos hidroméis em diferentes recipientes, onde: 1 – mosto controle; 2 – mosto suplementado com Enovit; 3 – mosto suplementado com maçã.

Fonte: Arquivo do autor.

Zardo et al. (2009) analisaram o conteúdo de compostos fenólicos totais em maçãs Gala e suas cultivares variantes Royal Gala e Galaxy Gala, sendo que o cultivar Gala, apresentou média de 906 µg/g, a menor concentração dentre as cultivares avaliadas.

Assim, a utilização de maçã na formulação de mosto de mel, além de favorecer o aumento da acidez total (Figura 11) também contribui para aumentar a concentração de compostos fenólicos, que estão presentes principalmente na casca da fruta (VIEIRA et al., 2011), contribuindo, desta forma, para as características sensoriais da bebida (SHI; MAZZA; MAGUER, 2002). Ressalta-se também o potencial antioxidante desta fruta (EBERHARDT; LEE; LIU, 2000).

Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005) analisaram a composição de diferentes tipos de hidromel, vinhos tinto e branco em termos de compostos fenólicos totais. Reportaram valores, equivalentes em ácido gálico, de 3102 mg/L, 227,5 mg/L, 300,6 mg/L e 167,16 mg/L de compostos fenólicos totais para vinhos tinto, branco, hidromel de *Fagopyrum esculentum* (escuro) e de *Glycine max* (claro), respectivamente. Estes autores reportaram ainda valores de 163,63 mg/L para Troy's Sweet e 149,03 mg/L para Troy's Dry, que são hidromeis encontrados no mercado.

Desta forma, verifica-se que os valores de compostos fenólicos encontrados no presente trabalho (Tabela 9), independentemente do tempo de envelhecimento e tipo de recipiente, são equivalentes aos valores reportados para o vinho branco e superiores àqueles encontrados nos diferentes tipos de hidromel analisados por Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005).

Wintersteen, Andrae e Engeseth (2005), demonstraram que existe uma forte correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante do hidromel. Esta correlação foi observada no presente trabalho, uma vez que o hidromel originado do mosto suplementado com maçã apresentou uma concentração de compostos fenólicos totais 29,5% superior ao hidromel controle e 28,7% superior ao hidromel cujo mosto foi suplementado com Enovit (Figura 12). Verifica-se também maior capacidade antioxidante entre os hidroméis obtidos a partir de mostos suplementados com maçãs, independente do recipiente onde ocorreu envelhecimento, conforme os resultados apresentados na Tabela 11.

Assim, fica demonstrado que a suplementação do mosto de mel com maçã permite obter uma bebida com características satisfatórias em termos de acidez total

e acidez fixa, além de apresentar compostos fenólicos totais em maiores concentrações conferindo propriedade antioxidante à bebida.

Tabela 11 - Atividade antioxidante dos hidroméis após o envelhecimento (expresso em % de redução do radical DPPH)

Hidromel	Recipiente de envelhecimento	Ativ. Antioxidante (%)
Controle	Tonel	47,10
Enovit	Tonel	44,58
Maçã	Tonel	63,98
Controle	Vidro	45,59
Enovit	Vidro	41,56
Maçã	Vidro	61,71
Controle	Plástico	46,10
Enovit	Plástico	30,98
Maçã	Plástico	60,45

4.8. Caracterização do hidromel em relação a compostos fenólicos, furânicos e aromáticos

O envelhecimento de vinhos em tonéis de carvalho é uma prática que contribui para a melhoria das características sensoriais da bebida (CERDÁN; AZPILICUETA, 2006; BAUTISTA-ORTÍN et al., 2008). A complexidade do aroma das bebidas envelhecidas aumenta devido à extração de certos compostos presentes na madeira, como, por exemplo, lactonas, guaiacol, 4-metilguaiacol, vanilina (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2008) e dependem de fatores como o tipo de madeira, tempo de contato entre o vinho, bem como a composição do vinho (CERDÁN; AZPILICUETA, 2006).

Nesta etapa do trabalho os hidromeis obtidos a partir das diferentes formulações foram submetidos ao envelhecimento por 216 dias em diferentes recipientes, sendo então caracterizados quanto a presença de compostos marcadores de envelhecimento, incluindo compostos furânicos 5-hidroximetilfurfural e furfural, bem como os compostos fenólicos voláteis vanilina e siringaldeído, cujos resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 13, 14, 15 e 16 e apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14.

Observa-se que as concentrações de 5-hidroximetilfurfural foram maiores para os hidroméis controle envelhecido em frasco de vidro (21,320 mg/L), obtido do mosto suplementado com Enovit e envelhecido em frasco de vidro (21,684 mg/L) e em frasco de plástico (21,537 mg/L). Verifica-se ainda que os menores valores foram obtidos quando o mosto de mel foi suplementado com maçã e envelhecido em tonel de carvalho (5,702 mg/L), bem como o hidromel sem suplementação (controle) envelhecido em frasco plástico (6,429 mg/L). Os demais apresentaram valores de concentração de 5-hidroximetilfurfural variando entre 10,530 e 14,471 mg/L.

Figura 13 - Concentração de 5-hidroximetilfurfural nos diferentes tipos de hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).

Fonte: Arquivo do autor.

Considerando que os compostos furânicos são derivados da desidratação de hexoses e pentoses formados durante a tostagem da madeira no processo de confecção dos tonéis (CERDÁN; GOÑI; AZPILICUETA, 2004), era esperado que as bebidas envelhecidas nos tonéis de carvalho apresentassem concentrações superiores, tanto para furfural quanto para 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Por outro lado, existem outros fatores que podem influenciar na concentração de 5-HMF no hidromel, como a qualidade do mel empregado para formulação do mosto. Neste contexto, ressalta-se que 5-HMF, como um produto de degradação de hexoses, é considerado como indicador do estado de conservação do mel, sendo que sua

concentração é diretamente proporcional ao tempo de armazenamento (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007).

A concentração dos compostos furânicos também podem originar em decorrência de reações químicas e bioquímicas que ocorrem durante o envelhecimento das bebidas e também do estado de conservação do tonel em que estas são armazenadas. Neste contexto, vale destacar que Cerdán e Azpilicueta (2006) avaliaram o efeito do emprego de tonéis de carvalho de segundo uso sobre a presença de compostos voláteis em vinhos. Como resultados os autores observaram que, quando comparados com tonéis novos, os de segundo uso resultaram em menor extração de compostos furânicos ao longo de 9 meses de envelhecimento. No entanto, após este período, a presença de 5-HMF nos vinhos avaliados foi totalmente eliminada.

No tocante ao furfural, observa-se na Figura 14 que os hidroméis envelhecidos nos tonéis de carvalho apresentaram concentrações superiores aos demais. Assim como o 5-HMF, o furfural também pode sofrer reações de redução, formando álcool furfurílico (não quantificado), o que contribui para alterar a sua concentração no hidromel (SPILLMAN et al., 1998). Cerdán e Azpilicueta (2006) observaram que a extração de furfural no período de 6 meses foi 98% maior em tonel novo quando comparado ao de segundo uso. No entanto, o envelhecimento por períodos de 12 a 15 meses resultou na estabilização da coconcentração deste composto em valores expressivamente inferiores aos observados com 6 meses de envelhecimento, corroborando com os resultados observados por Spillman et al. (1998) que justificou a redução da concentração de furfural em vinhos devido a sua redução, produzindo furfuril álcool, tanto por mecanismos bioquímicos promovidos por microrganismos, quanto por via química.

Figura 14 - Concentração de furfural no hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.-tonel de carvalho; V.-frasco de vidro; P.-frasco de plástico)

Fonte: Arquivo do autor.

Segundo Boidron, Chatonnet e Pons (1988), o furfural apresenta um limiar de percepção em vinhos da ordem de 20 mg/L. Neste contexto, vale destacar que os diferentes tipos de hidromel obtidos no presente trabalhos apresentaram concentrações de furfural acentuadamente inferiores a este valor. Segundo Reazin (1981) os compostos furânicos, mesmo em baixas concentrações, podem aumentar a percepção de aroma derivado de lactonas originadas do carvalho.

Observa-se também que o ácido gálico também foi detectado em concentrações mais elevadas nos hidroméis envelhecidos em tonéis de carvalho. Segundo Ribéreau-Gayon (2006), este ácido fenólico deriva da hidrólise de galotanino, tanino extraído da madeira durante o envelhecimento de vinhos. O ácido gálico é também um dos compostos encontrados em maior concecntração em aguardentes envelhecidas em tonéis de carvalho (ANJOS et al., 2011) e é um marcador de envelhecimento da bebida.

Na Figura 15 é possível observar que hidromel obtido a partir das diferentes formulações de mosto e envelhecido em tonéis de carvalho continham cerca de três vezes mais ácido gálico que aqueles envelhecidos nos recipientes de plástico ou vidro.

Figura 15 - Concentração de ácido gálico nos diferentes tipos de hidromel após 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).

Fonte: Arquivo do autor.

Vanilina é um composto formado pela degradação térmica da lignina durante a tostagem da madeira de carvalho para confecção de tonéis e é encontrada naturalmente em madeiras verdes (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2008). Este composto é considerado um importante colaborador para a qualidade de vinhos e destilados envelhecidos em tonéis de madeira (MORALES; BENITEZ; TRONCOSO, 2006).

A Figura 16 mostra as concentrações de vanilina de cada hidromel envelhecido em tonéis de carvalho e nos recipientes de vidro e plástico. É possível observar que os hidroméis envelhecidos em tonéis de carvalho extraíram vanilina da madeira, uma vez que os demais que foram envelhecidos em recipientes inertes, não apresentaram concentrações detectáveis de vanilina.

De acordo com Cerdán e Azpilicueta (2006), o limiar de percepção sensorial da vanilina é de 0,320 mg/L. Considerando os valores encontrados no presente trabalho, que variaram de 0,761 mg/L (controle) a 1,305 mg/L (mosto suplementado com maçã), pode-se concluir que o envelhecimento em tonéis de carvalho contribui para as características sensoriais do produto final obtido.

Figura 16 - Concentração de vanilina nos diferentes tipos de hidromelapós 216 dias de envelhecimento em diferentes recipientes (T.- tonel de carvalho; V. - frasco de vidro; P. - frasco de plástico).

Fonte: Arquivo do autor.

As Tabelas 12, 13 e 14 apresentam as concentrações de diferentes compostos fenólicos, furânicos e derivados ao longo do envelhecimento dos hidroméis em tonéis de carvalho. É possível observar que os hidroméis foram capazes de extrair compostos de forma contínua durante o período de envelhecimento, com ênfase para 5-HMF e vanilina. Nota-se que o furfural apresentou concentrações detectáveis a partir de 180 dias de envelhecimento no hidromel cujo mosto foi suplementado com maçã, enquanto que no hidromel controle e no hidromel de mosto suplementado com Enovit, o furfural foi detectado apenas no produto final, após os 216 dias de envelhecimento.

É possível observar também a presença de alguns produtos resultantes de alterações químicas dos compostos extraídos dos tonéis de carvalho, como por exemplo o ácido furóico, que é produto da oxidação dos furanos (furfural e 5-HMF) (FONSECA, 2014). O álcool vanilil e o ácido vanílico podem resultar da biotransformação da vanilina por determinadas cepas de *S. cerevisiae*, conforme verificado por Wulf et al. (1986). Diante do exposto verifica-se que o envelhecimento em tonéis de carvalho contribuiu com importantes compostos aromáticos, que interferem positivamente na qualidade sensorial da bebida.

Tabela 12 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos presentes no em hidromel (controle) envelhecido em tonel de carvalho

Composto	Tempo de envelhecimento (dias)					
	Início	45	90	135	180	216
ácido gálico	9,455	9,456	9,766	10,093	10,635	9,988
5-HMF	5,243	5,410	7,659	9,315	11,127	11,608
ácido furóico	5,186	6,506	7,408	7,319	7,267	16,416
Vanilina	0,745	0,704	0,738	0,744	0,761	0,761
álcool vanilil	0,000	4,619	11,212	10,935	10,736	12,491
furfural	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,601
ácido vanílico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,690
ácido siringico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,741
siringaldeído	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 13 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos contidos em hidromel (Enovit) envelhecido em tonel de carvalho

Composto	Tempo de envelhecimento (dias)					
	Início	45	90	135	180	216
ácido gálico	10,511	10,227	10,455	10,796	11,188	10,391
5-HMF	7,143	7,558	9,574	12,200	14,917	14,471
ácido furóico	6,306	7,062	7,531	7,926	8,010	14,031
Vanilina	0,598	0,662	0,682	0,722	0,743	1,154
álcool vanilil	0,000	0,000	26,806	24,370	23,680	24,756
furfural	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,508
ácido vanílico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,921
ácido siringico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,787
siringaldeído	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 14 - Concentração (mg/L) dos compostos fenólicos, furânicos e aromáticos contidos em hidromel (maçã) envelhecido em tonel de carvalho

Composto	Tempo de envelhecimento (dias)					
	Início	45	90	135	180	216
ácido gálico	4,975	8,451	8,835	9,335	9,482	9,533
5-HMF	3,679	4,173	5,894	6,310	5,593	5,702
ácido furóico	6,959	7,363	7,453	7,479	14,637	14,903
Vanilina	0,681	0,379	0,395	0,391	0,640	1,305
álcool vanilil	3,845	9,600	9,438	7,582	5,698	9,709
furfural	0,000	0,000	0,000	0,000	2,809	2,794
ácido vanílico	0,000	0,000	0,000	0,000	7,594	3,903
ácido siringico	0,000	0,000	0,000	0,000	1,302	1,491
siringaldeído	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,000

4.9. Avaliação Sensorial do Hidromel

Além das características físico-químicas e microbiológicas, que são fatores relevantes no lançamento de novos produtos alimentícios no mercado, deve-se levar em consideração as suas características sensoriais. Segundo Minim (2010), a análise sensorial de um alimento implica, entre outras coisas, a satisfação do consumidor, que tem o papel de determinar e avaliar os parâmetros de qualidade, permitindo identificar a qualidade relativa aos atributos do produto. Este autor menciona ainda que, neste contexto, os testes afetivos são uma importante ferramenta, uma vez que permitem conhecer a opinião do consumidor em relação às características sensoriais específicas ou globais de determinado produto, além de determinar o grau de aceitação por um determinado público.

Tendo em vista que os diferentes tipos de hidromel obtidos no presente trabalho apresentaram características físico químicas que atenderam aos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação, procedeu-se então a avaliação sensorial das respectivas bebidas quando estas foram submetidas ao processo de envelhecimento, por 7 meses, em diferentes tipos de recipientes. Assim, adotou-se como procedimento, para avaliação sensorial e teste de aceitação dos diferentes tipos de hidromel, conduzir as respectivas análises considerando a formulação do mosto que lhe deu origem.

4.9.1 Hidromel obtido de mosto sem suplementação (controle)

O hidromel produzido a partir de mosto de mel sem suplementação e submetido ao envelhecimento em diferentes tipos de recipientes, foi sensorialmente avaliado por 147 provadores, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 15 e Figura 17. Verifica-se que o tipo de recipiente utilizado para o envelhecimento não influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) na avaliação dos atributos cor, aroma e aparência. No entanto, em relação ao atributo impressão global, nota-se que o hidromel envelhecido em frasco de vidro apresentou valor significativamente superior ($p \leq 0,05$) aos demais. Nota-se, ainda, que o hidromel envelhecido em frasco de

plástico apresentou média significativamente superior ($p \leq 0,05$) quanto a impressão global, quando comparado com o hidromel envelhecido em tonel de carvalho.

Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) também foram observadas no tocante ao atributo sabor em relação aos recipientes avaliados. Nota-se que o hidromel envelhecido em frasco de plástico apresentou valor médio significativamente superior aos demais, sendo que a média obtida com o hidromel envelhecido em frasco de vidro foi superior ao hidromel envelhecido em tonel de carvalho.

As diferenças nas características físico-químicas podem ser levadas em conta para justificar os resultados encontrados nesta análise sensorial. O hidromel obtido de mosto sem suplementação e envelhecido em recipiente de plástico apresentou concentração de açúcares redutores residuais superior (5,27 g/L) quando comparado com o hidromel envelhecido em tonel de carvalho (3,71 g/L) e em frasco de vidro (2,50 g/L).

De acordo com a Portaria 299 de 1988 (BRASIL, 1988), que regulamenta as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho, vinhos de mesa com até 5,0 g/L de glicose são classificados como “seco”, enquanto que vinhos com concentrações de glicose na faixa de 5,1 a 20 g/L são classificados como “meio seco”. Seguindo esta classificação, pode-se inferir que o hidromel envelhecido em recipiente de plástico pode ser classificado como “meio seco”.

Karasz et. Al. (2005), ao avaliar a influência do envelhecimento na aceitação de vinhos brancos brasileiros, observou que os vinhos com maior aceitação eram mais doces, pouco ácidos e com menor grau alcoólico. Assim, considerando que os valores de acidez e teor alcoólico do hidromel envelhecido em recipiente de plástico são próximos aos valores encontrados nos demais hidroméis, pode-se inferir que a concentração de ART residual seria o fator principal que influenciou os provadores na análise sensorial do hidromel obtido de mosto sem suplementação (controle) no quesito sabor.

Tabela 15 - Médias das notas dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle) e envelhecido em recipientes de diferente natureza

Atributos	Médias		
	Tonel de Madeira	Frasco Plástico	Frasco de Vidro
Impressão Global	6,07 ^a	6,56 ^b	6,80 ^c
Cor	7,12 ^a	7,14 ^a	6,90 ^a
Aroma	6,28 ^a	6,69 ^a	6,49 ^a
Sabor	5,26 ^a	6,51 ^b	5,90 ^c
Aparência	6,86 ^a	7,01 ^a	6,89 ^a

* Médias com as mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

Figura 17 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle)

Fonte: Arquivo do autor.

Adicionalmente, a atitude de compra do hidromel obtido do mosto sem suplementação (controle) por parte dos provadores também foi avaliada. As notas obtidas nesta avaliação estão representadas na Figura 18.

É possível observar que a bebida que apresentou melhor avaliação para atitude de compra foi o hidromel envelhecido em frasco de plástico, com 38,8% dos provadores afirmando que provavelmente e 15,0% certamente comprariam a bebida. Estes resultados corroboram com as médias de notas recebidas pelo atributo sabor, justificada pela maior concentração de ART, característica que provavelmente

influenciou os provadores, assim como ocorreu com o hidromel produzido com mosto sem suplementação (controle).

Figura 18 - Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto sem suplementação (controle)

Fonte: Arquivo do autor.

4.9.2 Hidromel obtido de mosto suplementado com Enovit

O hidromel produzido a partir de mosto de mel suplementado com Enovit e submetido ao envelhecimento em diferentes tipos de recipientes, foi avaliado sensorialmente por 70 provadores, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 16 e Figura 19. Observa-se que as médias relativas aos atributos avaliados não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si para os diferentes tipos de recipientes utilizados no envelhecimento. Vale salientar que independente do recipiente utilizado para o envelhecimento as avaliações por parte dos provadores foram classificadas em “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” para os atributos de qualidade considerados.

Tabela 16 - Médias dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit e envelhecido em recipientes de diferentes naturezas

Atributos	Médias		
	Tonel de Carvalho	Frasco Plástico	Frasco de Vidro
Impressão Global	6,81 ^a	6,84 ^a	6,97 ^a
Cor	7,18 ^a	7,14 ^a	7,34 ^a
Aroma	6,60 ^a	6,66 ^a	6,90 ^a
Sabor	6,08 ^a	6,41 ^a	6,44 ^a
Aparência	7,10 ^a	7,13 ^a	7,31 ^a

* Médias com as mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

Figura 19 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit.

Fonte: Arquivo do autor.

No tocante aos resultados relativos a intensão de compra, cujos resultados se encontram demonstrados na Figura 20, nota-se que o hidromel envelhecido em frasco de plástico foi avaliado por 70 provadores, sendo que destes 41,4% afirmaram que provavelmente comprariam a bebida e 20% afirmaram que certamente comprariam. Assim, 61,4% dos provadores mostraram-se receptivos a esta bebida.

Figura 20 - Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com Enovit

Fonte: Arquivo do autor.

Observa-se ainda que o hidromel obtido do mosto de mel suplementado com Enovit e envelhecido em frasco de vidro obteve 50% de aceitação por parte dos provadores, sendo que 30% afirmaram que provavelmente comprariam e 20% certamente comprariam a bebida. No tocante ao hidromel envelhecido em tonel de carvalho, nota-se que 48,6% dos provadores afirmaram que provavelmente (34,3%) e certamente (14,3%) comprariam esta bebida.

4.9.3 Hidromel obtido de mosto suplementado com maçã

O hidromel produzido com mosto de mel suplementado com maçã e envelhecido, por 216 dias, em diferentes tipos de recipientes foi submetido a análise sensorial cujo painel de provadores foi constituído por 102 indivíduos, sendo os resultados demonstrados na Tabela 17 e Figura 21. Observa-se que dentre os atributos avaliados apenas sabor apresentou diferença significativa entre as bebidas estudadas. Neste contexto, destaca-se que o hidromel envelhecido em frasco de vidro apresentou nota média de 6,64 neste atributo sendo, significativamente

($p < 0,05$) superior ao hidromel envelhecido em frasco de plástico, que recebeu nota média 5,98 pelos avaliadores. Nota-se, ainda, que não existe diferença significativa neste atributo quando o hidromel foi envelhecido em frasco de vidro e tonel de carvalho.

Tabela 17 - Médias dos atributos de qualidade do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã e envelhecido em recipientes de diferentes naturezas

Atributos	Médias		
	Tonel de Carvalho	Frasco de Plástico	Frasco de Vidro
Impressão Global	6,86 ^a	6,75 ^a	7,05 ^a
Cor	7,05 ^a	7,17 ^a	7,18 ^a
Aroma	6,95 ^a	6,92 ^a	7,07 ^a
Sabor	6,26 ^{ab}	5,98 ^b	6,64 ^a
Aparência	7,20 ^a	7,33 ^a	7,41 ^a

* Médias com as mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente em um nível de confiança de 95%.

As notas conferidas pelos provadores aos diferentes atributos estudados permitem inferir que este hidromel foi avaliado como “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, quando envelhecido nos diferentes recipientes em estudo.

Figura 21 - Representação espacial das médias dos atributos avaliados no teste de aceitação do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã

Fonte: Arquivo do autor.

No tocante a intenção de compra por parte dos 102 provadores observa-se na Figura 22 que 38,2% provavelmente comprariam, enquanto 15,7% certamente comprariam o hidromel envelhecido em recipiente de vidro, totalizando 53,9% de provadores que mostraram boa aceitação pela bebida. Vale salientar que, considerando como rejeição à bebida as notas 1 (certamente não compraria) e 2 (provavelmente não compraria), o hidromel envelhecido em tonel de carvalho e frasco de vidro apresentaram maior rejeição por parte dos provadores, perfazendo 24,5% dos mesmos.

Segundo Cerdán e Azpilicueta (2006) fatores como a disponibilidade de extrativos disponíveis na madeira, tempo de contato entre o vinho e a madeira e a própria composição do vinho, interferem nas características sensoriais desta bebida. No presente trabalho foram utilizados tonéis de carvalho recondicionados, que passaram por um processo de raspagem e tostagem mas que, no entanto, não foram suficientes para interferir na qualidade sensorial dos hidroméis avaliados após 215 dias de envelhecimento. Desta forma, um período mais longo de envelhecimento certamente influenciaria positivamente na qualidade sensorial do hidromel.

Figura 22 - Histogramas de distribuição de notas para intenção de compra do hidromel obtido a partir do mosto suplementado com maçã.

Fonte: Arquivo do autor.

Cerdán e Azpilicueta (2006), ao avaliarem o efeito de tonéis novos e de segundo uso sobre a composição de compostos voláteis de vinhos, observaram que o período de 9 meses de envelhecimento resultou em vinhos com concentrações menores de compostos voláteis quando envelhecidos em tonéis de segundo uso. No entanto, durante o envelhecimento por períodos mais longos, o vinho envelhecido em tonel novo e em tonel de segundo uso não apresentaram diferenças nas concentrações dos compostos voláteis analisados.

5 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A utilização de leveduras comerciais, empregadas na produção de bebidas alcoólicas tradicionais, é uma alternativa viável para a produção de hidromel.
- As diferentes formulações de mosto de mel avaliadas permitiram obter hidromel com características físico químicas que atendem aos padrões estabelecidos pela legislação vigente.
- A suplementação do mosto com maçã resultou na obtenção de um hidromel com maior valor de acidez total, compostos fenólicos totais e potencial antioxidante.
- Nas condições de produção avaliadas, nenhum dos hidroméis produzidos apresentou quantidades de amins bioativas que pudessem oferecer risco aos consumidores
- O envelhecimento de hidromel em frascos de plástico levou a reduções do “extrato seco reduzido” para as diferentes formulações estudadas, sendo que o hidromel obtido do mosto controle e suplementado com Enovit apresentaram valores abaixo do mínimo estabelecido.
- O envelhecimento do hidromel em tonel de carvalho permitiu a extração progressiva de vanilina e ácido gálico, além de furfural e 5-hidroximetilfurfural, compostos importantes para o perfil aromático no hidromel.
- A análise sensorial demonstrou que os atributos avaliados foram pouco influenciados pela natureza dos diferentes recipientes utilizados no envelhecimento do hidromel. Influências significativas foram observadas

apenas nos atributos “impressão global” (mosto controle) e no “sabor” (mosto controle e suplementado com maçã).

- As maiores notas para “impressão global” e “sabor” foram atribuídas ao hidromel obtido do mosto controle e envelhecido em frasco de vidro e plástico, respectivamente.
- O atributo “sabor” para o hidromel obtido de mosto suplementado com maçã tem melhor aceitação quando este foi envelhecido em frasco de vidro.
- Considerando os atributos avaliados o hidromel envelhecido em recipientes de natureza inerte recebeu notas significativamente superiores..
- No tocante a avaliação da “intenção de compra” o hidromel obtido do mosto suplementado com Enovit, e sem suplementação (controle) e envelhecido em frasco de plástico, teve como resposta que “provavelmente” ou “certamente” comprariam esta bebida por parte de 61,4% e 53,8% dos provadores, respectivamente.
- O hidromel obtido de mosto suplementado com maçã e envelhecido em recipiente de vidro obteve boa aceitação pelos provadores sendo que 53,9% manifestaram que provavelmente ou certamente comprariam esta bebida.

REFERÊNCIAS

- ABRAMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. **Dados das Exportações de Mel**. 12 de agosto de 2014. Disponível em <http://www.brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_julho_2014.pdf>. Acessado em 22/08/2014.
- 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, 2002.
- ÁLAMO, M., NEVARES, I., GALLEGO, L., MARTIN, C., MERINO, S. Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. **Analytica Chimica Acta**, n. 621, p. 86-99, 2008.
- ALMEIDA, D. DE. **Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo. Piracicaba**. 2002. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2002.
- ANKLAN, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.
- ARRÁEZ-ROMÁN, D.; GÓMEZCARAVACA; A. M., GÓMEZ-ROMERO, M., SEGURA-CARRATERO; A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p. 1648, 2006.
- ARRUDA, A.R.; DE CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; DE ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 1648-1656, 2006.
- BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Osmo-, termo- and ethanol- tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* S. **Brazilian Journal of Microbiology**, nº1, v. 43, p. 157-166, 2012.
- BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; LENCINA, A. G.; CANO-LOPEZ, M.; PARDO-MINGUEZ, F.; LÓPEZ-ROCA; J. M., GÓMEZ-PLAZA, E. The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, nº 14, p. 63-70, 2008.
- BERRY, B. **The Global Mead Market**: Opportunities for canadian mead exporters. Agriculture and agri-food Canada. Agri-food trade service. Government of Canada. Disponível em : < <http://www.ats.agr.gc.ca/info/4347-eng.htm> >. Acesso em 16 jun. 2010.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822-828, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Portaria nº 64 de 23 de abril de 2008a.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62 de 23 de agosto de 2003.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Portaria n. 229 de 25 de outubro de 1988.

BOGDONOV, S. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. **Bee World**, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

CAMPOS, G.; DELLA MODESTA, R.C. Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1-2, p. 7-14, 2000.

BOTELHO, B. G. **Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas**. 2009, 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais - MG, 2009.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 33-41, 1999.

CASELLAS, G. B. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen contendo n wine yeast metabolismo**. Tese (Doutorado) – Universitat Rovira i Virgili, Barcelona, Espanha, 2005.

CAMPOS, G.; DELLA MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; RASLAN, D. S. Variação de alguns parâmetros do mel de melato em relação ao mel floral. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 59-64, 2001.

CERDÁN, T. G.; GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with diferente composition. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 349-356, 2004.

CERDÁN, T. G.; AZPILICUETA, C. A. Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 199-205, (2006).

CODEX ALIMENTARIUS. **Revised Codex Standard for Honey. Rev. 2** (2001). 24th session of the Codex Alimentarius in 2001. Disponível em : < http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310 >. Acesso em: 20 de abril de 2010.

COTER, P. D; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, n. 3, p. 429-445, 2003.

CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, 1975. 608 p.

CRANE, E. **O livro do mel**, 2^a Ed.. São Paulo: Nobel. 1985. 226 p.

CRECENTE, T. P.; LATORRE, C. H. Pattern recognition analysis applied to classification of honeys from two geographic origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 560-564, 1993.

RODRÍGUEZ, G. O.; FERRER, B. S.; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v. 84, p. 499-502, 2004.

DUTCROSKY, S. D. Análise sensorial: história, definição e aplicações. In: Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.

EBERHARDT, M. V., LEE, C. Y., LIU, R. H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, n 6789, p. 903-904, 2000.

ERASMUS, D. J.; MERWE, G. K.; VUUREN, H. J. J. Genom-wide expression. Analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, n° 3, p. 375-399, 2003.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A. P.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 46, p. 3774-3779, 2008.

FALLICO, B.; ZAPPALA, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305-313, 2004.

FERNANDES, D.; LOCATELLI, G. O.; SARTAZZINI, L. S. Avaliação de diferentes estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração. **Evidência – Ciência e Biotecnologia**, v. 9, n. 1-2, p. 29-42, 2009.

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

FLEET, G. H. **Wine microbiology and biotechnology**. Londres: Ed. Taylor & Francis Inc., 1993, p.314-315.

FRANKEL, E., N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P., I. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines, and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

GIUDICI, P.; KUNKEE, E. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing aminoacids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfite by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 1, p. 107-112, 1994.

GLORIA, M.B.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, n. 2, p. 129-136, 1999.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A., FACALANZZA, S. A. P., MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1123-1134, 2014.

GOMES, T.; BARRADAS, C.; DIAS, T.; VERDIAL, J.; MORAIS, J. S.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L. **Mead production**: Comparison of different production scales (preliminary results). Disponível em <http://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/3680>. Acesso em 07/2011.

GOMES, T.; BARRADAS, C.; DIAS, T.; VERDIAL, J.; MORAIS, J. S.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L. Mead production improvements after using a factorial design. In: **PROCEEDINGS OF THE 6TH CIGR SECTION**. INTERNATIONAL SYMPOSIUM "TOWARDS A SUSTAINABLE FOOD CHAIN", FOOD, BIOPROCESSING AND FOOD QUALITY MANAGEMENT. Abril, 2011, Nantes, França, b.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. O risco das aminas biogênicas nos alimentos. **Ciênc. saúde coletiva**, v.19, n.4, p. 1123-1134, 2014.

GRAZIANO, M. J.; BURING, J. E.; BRESHOW, J. L. Moderate alcohol intake increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions and decreased the risk of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1829-1834, 1993.

GUERRA, C. C.; BARNABÉ, D. Vinho. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas, matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, Legislação, Mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, p. 423-451.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. Biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, p. 21-68.

HOLLMAN, P. H.; TRIJP, J. M. P.; MENGELERS M. J. B.; de VRIES, J. H. M.; KATAN, M. B. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Letters**, v.114, p. 139-140, 1997.

HORN, H. **Intensive proctical cours on honey analysis**. Dissertação (mestrado) FFCLRP – Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado, 1996.

HORN, H. et al. Méis brasileiros: resultados de análise físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, nov. de 2006, Teresina. **Anais**. Teresina: CBA, 1996, p. 403-429.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 2004. 1004p, v. 4.

ILHA, E. C.; SANT'ANNA, E.; TORRES, R. C.; PORTO, A. C. MEINERT; E. M. Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production at laboratory scale. **Acta Científica Venezolana**, v. 51, p. 231-235, 2000.

IRANZO, J.F.; BRIONEZ-PÉREZ, A.I.; IZQUIERDO-CANÃS, P.M. Study of the oenological characteristics and enzymatics activities of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 15, p. 399-406, 1998.

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

JACSON, R. S. **Wine science: principles, practice and perception**. 2º Ed. California, Elsevier Science Publishers, 2000, 647 p.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-producing potencial of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 2, 1995.

JUSTINO, M.; MUTTON, R.; MUTTON, M. Aguardente. In: FILHO, W. G.V. **Tecnologia de bebidas**: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado, São Paulo. Ed. Edgard Blucher, 2005, p. 485-522.

KAPIOTIS, S.; HERMANN, M.; HELD, I.; SEELOS, C.; EHRINGER, H.; GMEINER, B. M. K. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 2868-2874, 1997.

KARASZ, P.; BENASSI, M. T.; YAMASHITA, F.; CECCHI, H. M. Influência do envelhecimento na aceitação e nas características físico-químicas de vinhos brancos riesling itálico brasileiros. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n.1, p. 45-50, 2005.

KUNKEE, R. E. Relationship between nitrogen content in must and sluggish fermentation. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINE. 1991, Seattle American Society for Enology and Viticulture. 1991, p. 148-155.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts**: A taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science, 1998.

LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; DOSTA, J.; TITERA, D.; KULT, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chemistry**, v. 101, p. 973-979, 2007.

LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, p. 87-95, 2007.

LASCEVE, G.; GONNET, M. Analyse pra radioactivation du contenu mineral d'un miel; Possiblé de preciser son origine. **Apidologia**, v. 5, n. 3, p. 201-223, 1974.

LEA, A.; DRILLEAU, J. F. Cider-making. In: Fermented beverage production. London: Ed. LEA, 2003, p. 59-87.

LIMA, N. E. F. **Perfil fenólico e atividade antioxidante de vinhos Goethe – Caracterização e evolução durante o armazenamento em garrafa**. 136 p. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), - Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MaCFIE H. J. H.; THOMSON D. M. H. **Measurement of food preferences**. Glasgow. Blackie Academic & Professional, 1994. 310 p.

MANCILLA-MARGALLI, N. A.; LOPEZ, M. G. Generation of Maillard compounds from inulin during thermal processing of *Agave tequilana* weber var. azul. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 806-812, 2002.

MARCHINI, L. C. **Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos.** 83p. Tese (Livre Docência), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2001.

MENDES, E.; BROJO PROENC-A., E.; FERREIRA, I. M. P. L.; FERREIRA, M. A. Quality evaluation of Portuguese honey. **Carbohydrate polymers**, v. 37, p. 219-223, 1998.

MERCOSUL. Regulamento Técnico Mercosul Identidade e Qualidade do Mel" MERCOSUL/GMC/RES. N° 56/99. Disponível em <http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/mel_rtfiq_mel_mercosul.htm> Acesso: junho de 2010.

MILLER, J. **The bee's lees.** A collection of mead recipes. Disponível em: <<http://brewery.org/library/beeslees.html>> Acesso: junho de 2010.

Minim, V. P. R.; **Análise Sensorial. Estudos com consumidores.** 3ª Ed. Ed. UFV, 332 p., 2013.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MORALES, M.; BENITEZ, B.; TRONCOSO, A. M. Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. **Food Chemistry**, n. 88, p. 305-315, 2004.

MORENO-ARIBAS, V.; POLO, M. C.; JORGANES, F.; MUNOZ R. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 117-123, 2003.

MORSE, R.; HOOPER, T. **Enciclopédia ilustrada de apicultura.** Portugal: América, 1986.

MORSE, R. A.; STEINKRAUS, K. H. Method of making wine from honey. Patente US n. 3.598.607. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br>>. Acesso em: maio de 2010.

MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 3, p. 95 – 101, 1998.

NAVRÁTIL, M.; STURDIK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilized, ethanol-tolerant yeast. **Biotechnology Letters**, v. 23, p.977-982, 2001.

NICOLAS, J. J. et al. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 109-157, 1994.

O'CONOR-COX, E. S.; INGLEDEW, W. M. Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 89-96, 1991.

ONO, B. I.; ISHI, N.; FUJINO, S.; AOYAMA, I. Role of hydrosulfide ions (HS-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3183-3186, 1991.

ORTIZ-VALBUENA, A. The ash content of 69 honey samples from La Alcarria and neighbouring areas, collected in the periods 1985-1987. **Cuadernos de Apicultura**, v. 40, p. 8-9, 1988.

PARRISH, M. E.; CARROL, D. E. Fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 38, n. 1, p. 45-48, 1987.

PAMPLONA, B. C. **Exame dos efeitos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas**. 131p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989

PEREIRA, A. P. R. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel**. 81p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal. 2008.

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.

POLO, L.; FERRER, S.; PENA-GALEGO, A.; HERNANDEZ-ORTE, P.; PARDO, I. Biogenic amine synthesis in high quality Tempranillo wines. Relationship with lactic acid bacteria and vinification conditions. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 191-198, 2011.

RAMALHOSA, E.; GOMES, T.; PEREIRA, A. P.; DIAS, T.; ESTEVINHO, L. M. Mead production: tradition versus modernity. **Advances in Food and Nutrition Research**. V. 63, p. 102-116, 2011.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 32, p. 283-289, 1981.

REDDY, L. V.; REDDY, Y. H. K.; REDDY, P. A.; REDDY, O. V. S. Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 148-152, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. **Handbook of enology** – the chemistry of wine, stabilization and treatments. V.2, 2ªEd. John Wiley & Sons, 2006, 441 p.

RIVALDI, J.D.; SILVA, M.M.; COELHO, T.C.; OLIVEIRA, C. T.; MANCILHA, I. M. Characterization and sensorial profile of mead produced by *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 60-63, junho de 2009.

RIZZON, L.A; MIELE, A. Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 297-300, 1996.

RIZZON, L.A; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, golden delicious e fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 750-756, dezembro de 2005.

ROCHA, D. C. **Apicultura**: exportação de mel em maio é a maior dos últimos 31 meses. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=340>>

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.

SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. **Food Microbiology**, v. 10, p. 517-523, 1993.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2014. **Oportunidades para o mercado de mel**, julho de 2010. Disponível em: <http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_06_06_RT_Agroneg%C3%B3cio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf>. Acesso em: 22/08/2014.

SEEMAN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**. Valdivia: Universidad Austral de Chile; Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 1988. 202p.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Alcohol-free red wine engances plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Nutrition**, v.128, p. 1003-1008, 1998.

SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M. L. **Functional foods**: biochemical and processing aspects. Ontario: CRC Press, 2002, 432 p.

SILVA, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGH, N., BATH, P. K. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. **Journal Food Science and Technology**, v. 35, p. 154-156, 1988.

SMIT, A.Y.; DU TOIT, W.,J.; DU TOIT M. Biogenic amines in wine: understanding the headache. **South African Journal of Enology and Viticulture**; n.29, v. 2, p.109-127, 2009.

SMITH, S.M. **PC-MDS multidimensional statistic package, version 5.1**. Provo, USA: Institute of Business MGT, Brightan Young University, Provo, UT. 1990.

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.

SODRÉ, G. DA S. **Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia**. 2000. 83p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SOLOVEVE, T. Y. Determination of adulteration of honey on the basis of characteristics of honeys for single or multiple flower sources. **Apicultural Abstracts**, v. 22, n. 1, p. 52-53, 1971.

SORIA, A. C.; GONZALEZ, M.; LORENZO, C. D. E. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physiochemical and volatile composition data. **Food Chemistry**, v. 85, p. 121-130, 2004.

SPILLMAN, P. J.; POLLNITZ, A. P.; LIACOPOULOS, D.; PARDON, K. H.; SEFTON, M. A. Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol and their ethyl ethers in barrel-aged wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, p. 657-663, 1998.

SPIROPOULOS, A.; TANAKA, J.; FLERIANOS, I.; BISSON, L. F. Characterization of hydrogen sulfide in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 233-248, 2000)

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

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a Review. **Journal of American Dietetic Association**, v. 96, p. 1027-1039, 1996.

SUZZI, G. P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and satability of the character. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 36-39, 1984.

TERAMOTO, Y.; SATO, R.; UEDA, S. Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine, *ogol*. **African Journal of Biotechnology**, v. 30, p 36-39, 1984.

TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; TAVUKCUOGLU, H. R. **Quality of honeys influenced by thermal treatment**. **LWT**, v. 41, p. 1396-1399, 2008.

UKPABI, U. J. Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 6, n.1, p. 37-41. 2006.

URIZI, P.; MONJE, M. C.; SOUCHARD, J. P.; ABELLA, A.; CHALAS, J.; LINDENBAUM, A.; GERGNES, L.; LABIDALLE, S.; NEPVEU, F. Antioxidant activity of phenolic acids and esters presente in red wine on human low-density lipoproteins. **Journal de Chimie Physique et de Physique**, n. 96, p.110-115, 1999.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 113-119, 1993.

VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. D. **Mel: características, análises físico-químicas, adulterações e transformações**. Barretos: Tecnológico Científico "Roberto Rios", 1984. 95p.

VIDRIH, R.; HRIBAR, J. Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. **Acta Alimentaria**, v. 36, n. 2, p. 151-162, 2007.

MOTA, R. V.; AMORIM, D. A.; FÁVERO, A. C.; GLORIA, M. B. A.; REGINA, M. A. (2009). Caracterização físico-química e aminas bioativas em vinhos da cv. Syrah I: efeito do ciclo de produção. **Food Science and Technology**, n.29 n. 2, p. 380-385, 2009.

VILELA-MOURA, A.; SHULLER, D.; MENDES-FAIA, A.; CÔRTES-REAL, M. Reduction of volatile acidity of wines by selected yeasts strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 881-890, 2008.

VINSON, J. A., HONTZ, B. A. Phenol antioxidante index: comparative antioxidante effectiveness of red and white wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 401-403, 1995.

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Cemistry**, n. 64, p. 235-301, 2000.

WHITE JÚNIOR, J. W. Honey. **Advances in Food Research**, v. 22, p. 287-374, 1978.

WHITE JÚNIOR, J. W. Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural and proline in honey; Collaborative study. **Journal of the Official Analytical Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 515-526, 1979.

WHITE JÚNIOR, J. W. La miel. In: DADANT, H. **La colmena y la abeja mellifera**. Montevideo. Ed. Hemisfério Sul, 1989.

WIESE, H. **Apicultura**: novos tempos. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2005, 378p

WINTERSTEEN, C. L.; ANDRADE, L. M.; ENGESETH, N. J. Effect of heat treatment and oxidant capacity and flavor volatiles of mead. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 70, n. 2, p. 119-126, 2005.

ZARDO, D. M., DANTAS, A. P., VANZ, R., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2009.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética na Pesquisa

**FACULDADES INTEGRADAS
TERESA D'ÁVILA/SP** **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudos dos parâmetros fermentativos na fabricação de hidromel.

Pesquisador: Flavio de Oliveira Ferraz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23309813.9.0000.5431

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 449.139

Data da Relatoria: 06/11/2013

Apresentação do Projeto:

O hidromel é uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação de uma solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável. É conhecida por diversas civilizações da antiguidade, no entanto, sua produção ainda ocorre de maneira empírica e artesanal, comprometendo a qualidade da bebida. Devido aos valores alcançados no mercado, a produção de hidromel torna-se uma atividade viável tanto na geração da renda familiar quanto para economia nacional, o que justifica o aprimoramento da tecnologia de produção de hidromel, visando a obtenção de um produto padronizado e de qualidade. Desta forma, no presente trabalho será abordado atividades que compreendem a caracterização da matéria prima, seleção de leveduras, determinação/otimização dos parâmetros fermentativos, produção de hidromel em escala "artesanal" e caracterização físico química e sensorial do produto final. A avaliação sensorial do hidromel será realizada nas instalações do Laboratório de Análise Sensorial da Planta Piloto de Bebidas do Departamento de Biotecnologia da EEL. Para tanto as amostras serão submetidas a teste de aceitação considerando os quesitos aparência, aroma, sabor, corpo e impressão global, além da atitude de compra. Para tanto, serão

Endereço: Avenida Peixoto de Castro, 539

Bairro: Vila Zélia

CEP: 12.606-580

UF: SP

Município: LORENA

Telefone: (12)2124-2888

E-mail: cep@fatea.br

FACULDADES INTEGRADAS TERESA D'ÁVILA/SP

Continuação do Parecer: 449.139

recrutados entre alunos, professores e funcionários da EEL, 120 julgadores, maiores de 18 anos. Serão realizados três testes em datas distintas, cada um com três amostras sendo cada uma delas originadas dos diferentes recipientes de maturação dos hidroméis. As amostras serão apresentadas aos julgadores em cabines individuais, de forma monádica e codificadas com algarismos de três dígitos, em taças de plástico transparente com não mais que 20 mL de hidromel. Os julgadores avaliarão as amostras de hidromel preenchendo uma ficha conforme apresentado a seguir, onde se observa uma escala hedônica não estruturada de 9 pontos, cujos resultados serão então submetidos à ANOVA e teste t de Student.

Objetivo da Pesquisa:

Contribuir para o aprimoramento da tecnologia de produção de hidromel, visando à obtenção de um produto padronizado e com qualidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

Conhecimento sobre uma bebida pouco difundida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Avenida Peixoto de Castro, 539

Bairro: Vila Zélia

UF: SP

Município: LORENA

Telefone: (12)2124-2888

CEP: 12.606-580

E-mail: cep@fatea.br

FACULDADES INTEGRADAS
TERESA D'ÁVILA/SP

Continuação do Parecer: 449.139

LORENA, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:
Claudia Lysia de Oliveira Araújo
(Coordenador)

Endereço: Avenida Peixoto de Castro, 539

Bairro: Vila Zélia

UF: SP

Município: LORENA

CEP: 12.606-580

Telefone: (12)2124-2888

E-mail: cep@fatea.br

ANEXO B - Caracterização físico-química dos hidromeis após envelhecimento em recipientes de vidro, carvalho e plástico

Anexo B - Caracterização físico-química dos hidromeis após envelhecimento em recipientes de vidro, carvalho e plástico

Parâmetro	Amostras armazenadas em Vidro			Amostras armazenadas em tonéis			Amostras armazenadas em plástico		
	Controle	Enovit	Maçã	Controle	Enovit	Maçã	Controle	Enovit	Maçã
Teor alcoólico (% v/v, 20°C)	11,6± 0,8 ^a	10,7± 0,7 ^{ab}	11,2± 0,7 ^a	11,7± 0,3 ^a	10,4± 0,2 ^b	11,4± 0,2 ^a	11,4± 0,2 ^a	11,5± 0,2 ^a	11,7± 0,4 ^a
Acidez volátil (meq./L)	2,29± 0,04 ^a	3,30± 0,12 ^b	3,30± 0,18 ^b	2,54± 0,08 ^c	3,05± 0,16 ^b	2,29± 0,08 ^{ae}	2,80± 0,08 ^d	2,54± 0,16 ^c	3,05± 0,08 ^b
Acidez fixa* (meq/L)	32,99	31,59	37,02	31,26	35,83	46,76	33,00	38,04	43,6
Acidez total (meq/L)	35,28± 0,48 ^a	34,89± 0,51 ^a	40,32±0,43 ^b	33,80± 0,55 ^c	38,88± 0,42 ^d	49,05±0,53 ^e	35,80± 0,55 ^a	40,58± 0,42 ^b	46,65±0,53 ^f
ART residual (g/L)	2,50± 0,12 ^a	3,96± 0,11 ^b	1,66± 0,21 ^c	3,71 ± 0,21 ^b	8,02 ± 0,11 ^d	1,71 ± 0,23 ^c	6,48± 0,12 ^e	11,37± 0,11 ^f	5,32± 0,21 ^g
Extrato seco reduzido (g/L)	16,20±0,08 ^a	17,74±0,17 ^b	11,29±0,03 ^c	14,64±0,13 ^d	22,18±0,17 ^e	11,84±0,15 ^f	5,27±0,18 ^g	6,08±0,11 ^h	14,68±0,09 ^d

*Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student a 5% de significância.