

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JOÃO PAULO FERNANDO MILESKI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO
DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURAS *Saccharomyces***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA
2016

JOÃO PAULO FERNANDO MILESKI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO
DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURAS *Saccharomyces***

Dissertação de mestrado, apresentada ao Curso de Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivane Benedetti Tonial
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Lucchetta

LONDRINA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

M643p Mileski, João Paulo Fernando
Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras
Saccharomyces / João Paulo Fernando Mileski. - Londrina : [s.n.], 2016.
72 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ivane Benedetti Tonial
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Lucchetta
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2016.
Bibliografia: f. 59-64.

1. Mel. 2. Fermentação. 3. Bebidas fermentadas. 4. Leveduras. I. Tonial, Ivane Benedetti, orient. II. Lucchetta, Luciano, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

FOLHA DE APROVAÇÃO Nº 41

**“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO DIFERENTES
CEPAS DE LEVEDURAS *Saccharomyces*”**

por

JOÃO PAULO FERNANDO MILESKI

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS** – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Francisco Beltrão, às 14 horas e 30 minutos do dia 09 de agosto de 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora composta por:

Dr.^a Ivane Benedetti Tonial
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão
Orientadora

Dr.^a Silvane morés
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão
Membro examinador Titular

Visto da coordenação:

Dr.^a Maria Cristina Milinsk
UFPR Câmpus Palotina
Membro Examinador Titular

Dr. Fábio Augusto Garcia Coró
UTFPR Câmpus Londrina
(Coordenador do PPGTAL)

Observação: A folha de aprovação original assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado – PPGTAL.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora Prof^a. Dra. Ivane Benedetti Tonial pela forma que me acolheu no programa de mestrado (PPGTAL) e pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Ao meu ao meu coorientador Prof. Dr. Luciano Lucchetta, por toda sua colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição dedicadas a esta dissertação.

A Prof^a Dra. Silvane Morés, por ter me conduzido até a UFSC para realização da identificação dos compostos voláteis do hidromel e por toda a contribuição neste trabalho.

Ao CNPQ, por financiar o projeto.

Aos meus colegas de sala de aula.

Aos meus amigos e técnicos de laboratórios pela colaboração.

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

MILESKI, João Paulo Fernando. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces***. 86 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

A apicultura é uma atividade econômica importante no Sudoeste do Paraná e o desenvolvimento de produtos à base de mel pode ser uma importante alternativa para o escoamento da produção e ao mesmo tempo uma interessante forma de agregar valor ao produto. O hidromel é uma bebida fermentada obtida pela diluição do mel em água com adição de nutrientes e leveduras. Em algumas regiões da Europa é uma bebida muito consumida e apreciada, no Brasil, no entanto, é pouco conhecida e explorada. O presente estudo tem por objetivo investigar o processo de fermentação alcoólica do mel, com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, produzir e avaliar o hidromel fresco e maturado. O mel para o desenvolvimento do estudo foi adquirido na Associação dos Apicultores do Município e submetido à caracterização físico-química e de adulteração, os resultados demonstraram que a matéria prima apresentava padrão de qualidade e identidade característico do mel puro de abelhas (*Apis mellifera*). Conhecendo a qualidade da matéria prima, três tipos de diferentes leveduras (*Red Star champagne*, *Lalvin EC 1118* e *Fleischmann*) foram utilizados para produção de hidromel. O produto final foi caracterizado através de análises físico-químicas e os compostos voláteis foram identificados e quantificados por cromatografia. Dentre as cepas utilizadas, a levedura *Red Star champagne* apresentou maior capacidade de converter açúcar em álcool (etanol), produzindo a bebida com maior teor alcoólico. A levedura *Lalvin EC 1118* produziu uma bebida mais equilibrada quanto ao teor alcoólico e açúcares reductores residuais, enquanto a levedura *Fleischmann* apresentou menor capacidade de conversão de açúcar em álcool, fornecendo a bebida com menor teor alcoólico. O perfil de compostos voláteis apresentou-se de maneira similar nas três formulações de hidromel elaborado com as diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, entretanto, a bebida produzida a partir da cepa *Fleischmann*, apresentou de modo geral, maior concentração de ésteres relacionados ao aroma frutado e floral, sendo esta a preferida sensorialmente e submetida à maturação em tonéis de carvalho e bálsamo por um período total de 180 dias. O carvalho apresentou maior capacidade de alterar as características físico-químicas e de cor da bebida, o que não indica que o bálsamo não possa ser considerado uma boa alternativa para maturação de hidromel.

Palavras-chave: Mel. Fermentação. Leveduras. Hidromel.

ABSTRACT

MILESKI, João Paulo Fernando. **Production and characterization of mead using different strains of *Saccharomyces* yeasts**. 86 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

Beekeeping is an important economic activity in the Southwest of Paraná and the development of honey-based products can be an important alternative to the flow of production and at the same time an interesting way to add value to the product. The mead is a fermented beverage obtained by dilution of the honey in water with addition of nutrients and yeast. In some parts of Europe is a drink very consumed and appreciated in Brazil, however, it is little known and exploited. This study aims to investigate the process of alcoholic fermentation of honey with different strains of *Saccharomyces* yeast, produce and evaluate fresh and matured mead. The honey for the development of the study was acquired in the Beekeepers Association of the City and subjected to physical and chemical characterization and adulteration, the results showed that the raw material had quality standard and characteristic identity of pure honey bees (*Apis mellifera*). Knowing the quality of raw material, three different types of yeast (*Red Star champagne*, *Lalvin EC* and *1118 Fleischmann*) were used for production of mead. The final product was characterized by physical-chemical analysis, volatile compounds were identified and quantified by chromatography. Sensory analysis was performed to identify the greater acceptance of sample, which was subsequently submitted to maturation in oak barrels and balsam. Among the strains used, the yeast *Red Star Champagne* showed higher ability to convert sugar into alcohol (ethanol), producing a beverage with higher alcohol content. The *Lalvin EC 1118* yeast produced a more balanced drink on the alcohol content and residual reducing sugars, while *Fleischmann* yeast showed less sugar conversion capacity in alcohol, providing drinking less alcohol. The profile of volatile compounds presented in a similar fashion in the three mead formulations developed with different strains of *Saccharomyces* yeasts, however, the beverage produced from *Fleischmann* strain showed generally higher amounts of esters linked to fruity aroma and floral. Sensory analysis indicated the drink produced by *Fleischmann* yeast as the preferred, which was aged in oak barrels and balsam, the maturation stage had a total of 180 days. Among the wood used for the maturation, oak showed greater ability to alter the physical and chemical characteristics of the drink, the color parameter has also been changed more intensely by maturation in oak, which does not indicate that the balsam can not be considered a good alternative to mead maturation.

Keywords: Honey. Fermentation. Yeasts. Mead.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cartograma da produção de mel de abelhas no Paraná.....	12
Figura 2 – Leveduras em processo de multiplicação.....	17
Figura 3 – Conversão da Glicose em etanol pela ação das leveduras.....	18
Figura 4 – Conversão estequiométrica de glicose em etanol.....	18
Figura 5 – SPME, extração e dessorção de analitos.....	26
Figura 6 – Diagrama de cores.....	27
Figura 7 – Variação do ° Brix (consumo de substrato) ao longo do tempo.....	41
Figura 8 – Contagem em Câmara de <i>Newbauer</i>	43
Figura 9 – Cromatogramas sobrepostos.....	46
Figura 10 – Análise de componentes principais.....	51
Figura 11 – Imagens fotográficas do hidromel maturado.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos principais ésteres.....	24
Tabela 2 – Dados relativos à quantificação dos compostos voláteis.....	36
Tabela 3 – Caracterização físico-química do mel.....	39
Tabela 4 – Testes de adulteração (fraude) na amostra de mel.....	40
Tabela 5 – Taxa de inoculação, contagem e taxa de crescimento.....	42
Tabela 6 – Caracterização físico-químicas das bebidas fermentadas.....	44
Tabela 7 – Fragmentação, tempo de retenção e percentual de certeza.....	47
Tabela 8 – Concentração dos compostos voláteis nas amostras de hidromel....	48
Tabela 9 – Médias das notas dos tributos cor, aroma e sabor, bem como da intenção de compra, obtidos em análise sensorial.....	50
Tabela 10 – Resultados da determinação de cor, hidromel fresco e maturado...	53
Tabela 11 – Caracterização físico-química do hidromel maturado.....	55

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	09
2.0 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 Apicultura.....	12
3.2 Produtos obtidos do mel.....	14
3.3 Hidromel.....	15
3.4 Produção de hidromel.....	16
3.5 Processo fermentativo.....	17
3.6 Maturação do hidromel.....	21
3.7 Consumo de hidromel.....	22
3.8 Compostos voláteis no hidromel.....	23
3.8.1 Técnicas de análise de compostos voláteis.....	24
3.9 Colorimetria.....	26
3.10 Análise sensorial.....	27
4.0 MATERIAS E MÉDODOS.....	30
4.1 Materias.....	30
4.2 Análise físico-química do mel.....	31
4.2.1 Umidade/Sólidos solúveis.....	31
4.2.2 Cinzas	31
4.2.3 Açúcares redutores.....	31
4.2.4 Sacarose aparente.....	31

4.2.5 Acidez.....	32
4.2.6 Hidroximetilfurfural.....	32
4.2.7 pH.....	32
4.3 Testes de adulteração do mel.....	32
4.4 Produção do hidromel.....	32
4.4.1 Preparo do inóculo.....	32
4.4.2 Preparo do mosto.....	33
4.4.3 Fermentação.....	33
4.4.4 Maturação do hidromel.....	33
4.5 Caracterização físico-química do hidromel.....	34
4.5.1 Densidade relativa.....	34
4.5.2 Teor alcoólico real.....	34
4.5.3 Extrato seco.....	34
4.5.4 Açúcares redutores.....	34
4.5.5 Acidez total, fixa e volátil.....	35
4.5.6 Identificação e quantificação de compostos voláteis.....	35
4.6 Determinação de cor.....	36
4.7 Análise sensorial.....	37
4.8 Tratamento de dados.....	37
4.9 Aspectos éticos.....	38
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Caracterização do mel.....	39
5.2 Processo Fermentativo.....	40
5.3 Caracterização físico-química do Hidromel.....	43
5.4 Composição volátil dos hidroméis.....	45
5.5 Avaliação Sensorial do hidromel.....	50
5.6 Avaliação físico-química do hidromel maturado.....	52
6.0 CONCLUSÃO.....	57
8.0 REFERÊNCIAS.....	58
9.0 APÊNDICES.....	64

1.0 INTRODUÇÃO

A apicultura é uma das atividades mais antigas e importantes do mundo. Trata-se de uma atividade lucrativa e pode ser praticada pelo pequeno produtor rural ou agricultor familiar (WIESE, 2005; BARBOSA et al., 2007).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2013, o Brasil produziu 35.364 toneladas de mel, movimentando cerca de 263 milhões de reais (IBGE, 2013). Não há dúvidas de que a apicultura é uma atividade econômica positiva, que gera empregos, fluxo de renda e que propicia a fixação do homem no meio rural.

O principal produto proveniente da apicultura é o mel, alimento natural de grande valor nutritivo e funcional, contém cerca de 200 substâncias sendo as principais: açúcares, água, minerais, proteínas, vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, flavonóides, enzimas e outros fitoquímicos (PEREIRA, 2008).

No processo de extração do mel há perdas consideráveis do produto, pois quantidades significativas ficam retidas nos utensílios e equipamentos utilizados na atividade. O mosto proveniente da lavagem destes materiais apresenta grandes concentrações de mel (FERNANDES et al., 2006), podendo ser utilizado para produção de outros alimentos.

O mel perdido na extração, retido nos opérculos não pode ser comercializado como mel puro, pois até o término de desorperculação este mel hidrata-se a um valor superior a 20%, máximo permitido para a comercialização (FERNANDES et al., 2006).

Neste sentido, Matietto et al. (2006) relata que o aproveitamento do mel, na fabricação de produtos alimentícios, vem como uma alternativa complementar na renda familiar de apicultores, agregando valor aos produtos, com tecnologias relativamente simples para a comercialização de produtos artesanais, sendo uma delas a produção de hidromel (ROCHA, 2007).

O hidromel é uma bebida alcoólica produzida através da fermentação, realizada por leveduras (NAVRÁTIL et al., 2001), de uma solução diluída de mel, obtida através da adição de uma quantidade adequada de água. A Instrução Normativa nº 64 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008) preconiza que o teor alcoólico desta bebida deve apresentar variação de 4 –

14%. No entanto, na Europa, onde este tipo de bebida é bastante consumida e apreciada, o teor alcoólico pode variar de 8 – 18% (NAVRÁTIL et al., 2001)

O hidromel pode ser classificado como seco, licoroso, doce e espumoso, de acordo com sua tecnologia de fabricação. Esta classificação varia de acordo com o tempo de fermentação, quantidade e qualidade do mel utilizado na diluição, escolha da levedura e da graduação alcoólica.

Sendo uma bebida pouco conhecida e explorada no Brasil, o presente estudo busca gerar informações científicas acerca da produção e caracterização de hidromel de modo a contribuir com a comunidade científica além de fornecer subsídios para o desenvolvimento do produto e agregação de valor à matéria prima, propondo uma nova oportunidade de negócio aos apicultores da região.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo produzir e caracterizar hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras, a fim de avaliar o impacto desta variável sob a qualidade do produto final.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Produzir hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, caracterizá-los quanto suas propriedades físico-químicas, sensoriais, identificar e quantificar os compostos voláteis presentes nas amostras.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características físico-químicas do mel (pH, umidade, cinzas, açúcares redutores, sacarose aparente, acidez, e hidroximetilfurfural – HMF);
- Realizar testes de adulteração na amostra de mel;
- Analisar o processo de fermentação alcoólica do mel, com uso de diferentes leveduras para produção de hidromel;
- Determinar as características físico-químicas;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis dos hidroméis produzidos;
- Avaliar a aceitação sensorial do hidromel produzido com as diferentes leveduras.
- Realizar a maturação do hidromel que obtiver melhor desempenho em análise sensorial, em tonéis construídos de diferentes madeiras (Carvalho e Bálamo).
- Executar caracterização físico-química e determinação de cor do hidromel maturado.

3.0 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Apicultura

A apicultura é uma das atividades mais antigas e importantes do mundo, trata-se de uma atividade lucrativa e pode ser praticada pelo pequeno produtor rural ou agricultor familiar (WIESE, 2005; BARBOSA et al., 2007).

O principal produto proveniente da apicultura é o mel, alimento natural de grande valor nutricional. Contém cerca de 200 substâncias sendo as principais: açúcares, água, minerais, proteínas, vitaminas, lipídios, ácidos orgânicos, compostos fenólicos enzimas e outros fitoquímicos (PEREIRA, 2008).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2014 o Sudoeste do Paraná produziu 370.432 Kg de mel, movimentado R\$ 2.801.000,00, Francisco Beltrão foi o Município do Sudoeste do Paraná que mais produziu mel em 2014, 66.000 Kg (IBGE, 2014).

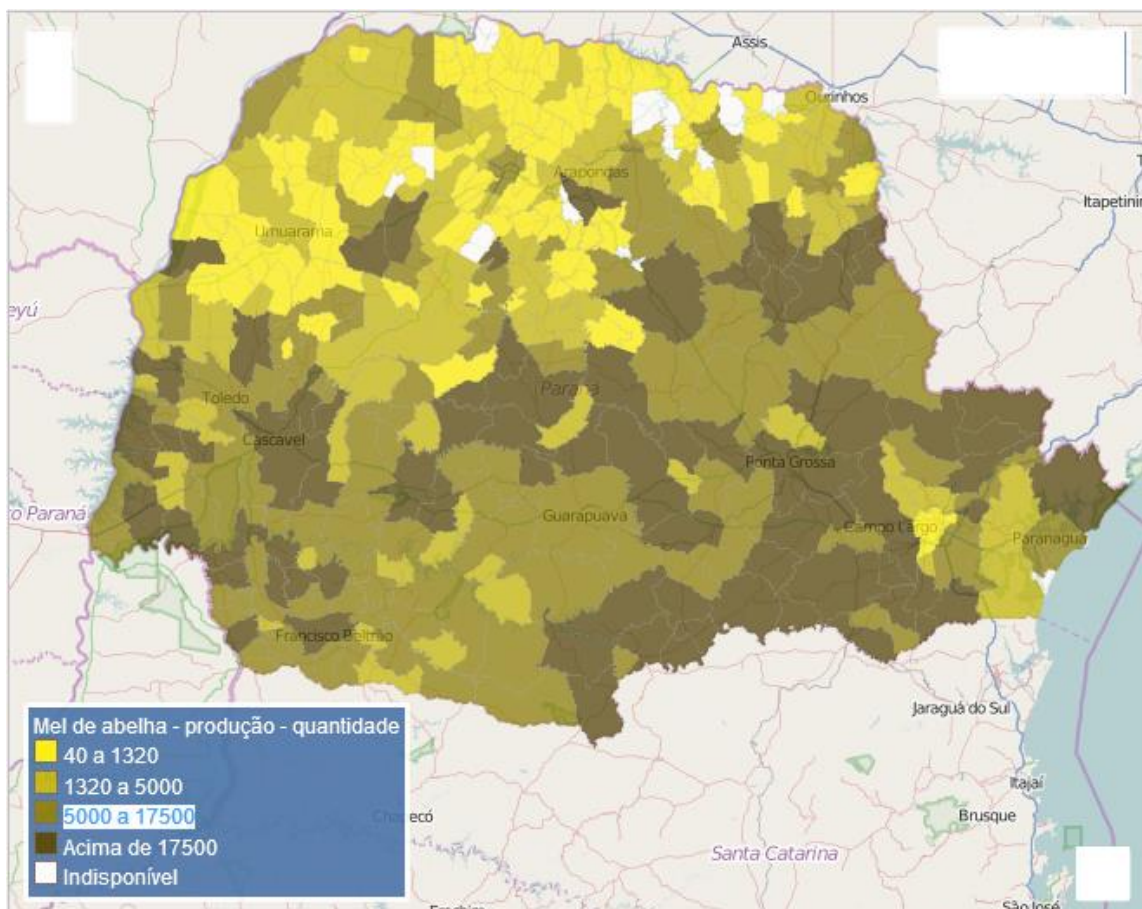


Figura 1. Cartograma da produção de mel de abelhas no Paraná em 2014.
Fonte: (IBGE, 2014).

Inúmeros estudos indicam que o mel já existe aproximadamente há 42 milhões de anos. Há evidências do seu uso na pré-história, através de pinturas em rochas que retratam abelhas e favos. O mel é um produto natural muito apreciado, sendo uma das formas concentrada de açúcar disponível em grande parte do mundo.

O néctar pode provir de uma única flor (mel monofloral) ou de várias (mel multifloral), podendo o primeiro não ser rigorosamente monofloral devido à presença de outro néctar em pequena quantidade, não interferindo apreciavelmente no seu aroma, cor e sabor (ALVES, 2005).

O pH do mel pode variar entre 3,4 e 6,1, sendo a média de 3,9. A sua cor varia entre quase incolor a castanho-escuro (CODEX ALIMENTARIUS, 2001), dependendo da sua origem floral, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura à qual o mel amadurece na colméia (SMITH, 1967). Além disso, quanto mais escuro for o mel, mais rico será em minerais. Contudo, geralmente este é mais desvalorizado economicamente, uma vez que os méis claros são mais aceitos no mercado mundial.

Além dos compostos já citados, outros de semelhante importância também podem ser obtidos a partir da apicultura, dentre os quais, a cera, que é industrialmente utilizada em produtos de beleza, medicamentos e velas; a própolis, usada industrialmente para produção de artigos de beleza e medicamento; o pólen apícola, produto rico em proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, a geléia real, que é rica em proteínas, água, açúcares, gorduras e vitaminas e a apitoxina (veneno das abelhas) é usada como medicamento no tratamento de doenças reumáticas (WIESE, 2005; MATTIETTO, et al., 2006; BARBOSA et al., 2007).

No processo de extração do mel há perdas consideráveis do produto, pois, quantidades significativas ficam retidas nos utensílios e equipamentos utilizados na atividade. O mosto proveniente da lavagem destes materiais apresenta grandes concentrações de mel (FERNANDES; SCARTAZZINI, 2006), podendo ser utilizado para produção de outros alimentos.

Outra consideração a se fazer, é que os méis retidos nos opérculos e o mel perdido na extração não podem ser comercializados como mel puro, pois até o término de desorperculação este mel hidrata-se a um valor superior a 20%, máximo permitido para a comercialização (FERNANDEZ et al., 2009).

Neste sentido, de acordo com Matietto et al. (2006) o aproveitamento do mel, na fabricação de produtos alimentícios, vem como uma alternativa complementar na renda familiar de apicultores, agregando valor aos produtos, com tecnologias relativamente simples para a comercialização de produtos artesanais. Uma das formas de aproveitamento do mel rejeitado que pode viabilizar uma alternativa para o aumento da rentabilidade comercial dos apicultores no Brasil é a produção de hidromel (ROCHA, 2007).

3.2 Produtos obtidos do mel

O mel é amplamente utilizado como adoçante natural em inúmeros pratos e bebidas, além disso, muitos outros produtos podem ser obtidos a partir do mel, produtos alimentícios como doces, balas, barras de cereais com mel, vinagre de mel, molho de mostarda ao mel, entre outros. Bebidas obtidas a partir do mel também são recorrentes, cachaça de mel, poncha (aguardente com mel e suco de limão) e o hidromel, a mais relevante bebida obtida a partir do mel (YUCEL e SULTANOGLU, 2013).

Entre os produtos de beleza e higiene corporal é possível produzir-se um sabonete vegetal de mel e óleo de amêndoas doces, recomendado principalmente para pessoas de peles sensíveis.

Devido ao seu alto teor de açúcar, o mel é usado como conservante de alimentos, sendo também uma excelente opção nutricional devido aos seus benefícios demonstrados para a saúde a nível do efeito bactericida, anti-séptico, anti-reumático, diurético, digestivo, prevenção de gripes e constipações, etc (GOMES, 2010).

Além dos compostos já citados, outros de semelhante importância também podem ser obtidos a partir do mel, dentre os quais, a cera, que é industrialmente utilizada em produtos de beleza, medicamentos e velas; a própolis, usada industrialmente para produção de artigos de beleza e medicamento; o pólen apícola, produto rico em proteínas, lipídios, minerais e vitaminas; a geleia real, que é rica em proteínas, água, açúcares, gorduras e vitaminas e a apitoxina (veneno das abelhas) é usada como medicamento no tratamento de doenças reumáticas (WIESE, 2005; MATTIETTO, et al., 2006; BARBOSA et al., 2007).

3.3 Hidromel

Produtos fermentados à base de mel, como o hidromel, são largamente conhecidos e consumidos na Europa. Porém, no Brasil, produtos com esta característica ainda são pouco populares, talvez pela falta de conhecimento e/ou estudos tecnológicos para sua obtenção (MATTIETTO et al., 2006).

O hidromel é uma bebida reconhecida como das mais antigas consumidas pelo homem, talvez mesmo antes do vinho e é provavelmente a precursora da cerveja (PEREIRA, 2008). O vinho do mel (hidromel) trata-se de uma bebida fermentada à base de mel, água e leveduras, podendo ser adicionado ervas, especiarias e frutas, quanto seu teor alcoólico pode variar de 8 a 18% em volume de álcool.

A fermentação do hidromel pode levar alguns meses ou até anos e é dependente principalmente do tipo de mel, da levedura, da nutrição e do controle de pH (NAVRATIL et al., 2001, SROKA e TUSZYNSKI, 2007, KAHOUN et al., 2008, MENDES-FERREIRA et al., 2010). O hidromel pode ser classificado em seco, licoroso, doce e espumoso, segundo a sua tecnologia de fabricação. Esta produção depende do tempo de fermentação, da quantidade de mel utilizada e da graduação alcoólica resultante da adição de aguardente vínica.

Antigamente, na produção do hidromel, a fermentação alcoólica era resultado do crescimento de micro-organismos selvagens naturalmente presentes no mel. Nestes casos, a fermentação alcoólica é imprevisível e, muitas vezes, torna o hidromel intragável pela presença de leveduras contaminantes e de bactérias que alteram as propriedades sensoriais. Recentemente, cepas selecionadas e leveduras comerciais têm sido usadas para reduzir os riscos de contaminação e para se ter maior controle durante o processo fermentativo (MENDES-FERREIRA et al., 2010, ROLDAN et al., 2011). A levedura da estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção de vinho, champagne e de cerveja, tem sido utilizada com sucesso na produção de hidromel (PEREIRA et al., 2009, MENDES-FERREIRA et al., 2010, ROLDAN et al., 2011).

O alto teor de açúcar do mel quando diluído para produção do hidromel, é fermentado pelas leveduras da espécie (*Saccharomyces cerevisiae*). As leveduras utilizadas na produção de vinho de mel são geralmente as estirpes empregadas na produção de vinho, cerveja e champanhe (SCHULLER e CASAL, 2005).

3.4 Produção de Hidromel

O hidromel é produzido considerando as etapas de preparação e correção do mosto, preparo do pé de cuba, inoculação de leveduras, fermentação, clarificação, maturação e envase (MATIETTO et al., 2006).

As condições dos processos de fermentação comercial, tais como o pH, a temperatura e os componentes do meio, geralmente não são divulgados, mas sujeitos a sigilo absoluto. Segundo Zabriskie et al. (1982) apud Gomes (2010), o "meio de fermentação ideal" não se encontra bem definido e o "desenvolvimento do meio de fermentação é uma mistura de arte e ciência". A otimização do meio de fermentação representa um custo significativo e implica em tempo para o desenvolvimento do bioprocesso. O objetivo da otimização é determinar as condições adequadas em termos de pH, temperatura, composição do meio, dentre outros fatores, de forma a maximizar ou minimizar econômica e tecnologicamente as variáveis importantes do processo, tais como o rendimento do processo, a concentração do produto e os custos.

Com o objetivo de determinar o meio ideal de fermentação, Mendes-Ferreira et al. (2010) preparam mosto a partir da diluição de mel com água potável em uma proporção de 37 g/100mL, a mistura homogeneizada apresentou 22,2 °Brix, o que tem potencial para se obter hidromel com aproximadamente 11% de álcool. Os autores avaliaram os parâmetros de pH, °Brix, acidez total e concentração de nitrogênio assimilável. Os parâmetros foram ajustados pela adição de ácido málico, tartarato de potássio e fosfato de amônio em diferentes proporções. A taxa de inoculação foi de 10^5 UFC/mL e temperatura de fermentação de 22 °C em ambiente anaeróbio.

Para avaliar a composição do aroma do hidromel e verificar a influência das condições de fermentação nas características sensoriais, Mendes-Ferreira et al. (2010) realizaram a identificação e quantificação de dezesseis compostos aromáticos produzidos durante o processo de fermentação.

Estudos científicos relacionados a produção e avaliação de hidromel são escassos, entretanto observou-se que suplementação com nitrogênio é uma prática amplamente aceita na sua produção. Na literatura consultada não foi encontrado relatos referentes ao crescimento de leveduras e atividade de fermentação, bem como sobre sua qualidade sensorial.

A fim de determinar a interferência na qualidade do hidromel pela utilização de leveduras selecionadas, Pereira et al. (2009) realizaram importante trabalho, submetendo cepas de leveduras a condições de estresse pela adição de etanol em níveis que variaram de 5 a 20%, a resistência das leveduras ao dióxido de enxofre foram testadas pela adição de dióxido de enxofre em nos seguintes níveis 100, 250 e 500 mg.L⁻¹, para induzir ao choque osmótico as leveduras foram expostas a meio contendo 40% de açúcares.

As leveduras selecionadas foram postas a prova em processo de fermentação contra leveduras não submetidas ao estresse, utilizando dois tipos diferentes de méis, um mais claro pobre em minerais e um mais escuro rico, em nutrientes. Após acompanhamento do processo de fermentação e caracterização dos hidroméis produzidos, os autores concluíram que, a qualidade do mel, preparo do mosto e a suplementação com nutrientes são as variáveis mais importantes na produção de hidromel.

3.5 Processo fermentativo

Devido ao elevado teor de açúcares no mel, o processo fermentativo é bastante moroso, sendo a variedade do mel, a estirpe da levedura, os nutrientes disponíveis e o pH do meio (NAVRÁTIL et al., 2001), variáveis importantes que afetam a produção e qualidade do produto final.

Leveduras são micro-organismos unicelulares, eucariotos, pertencem ao Reino *Fungi*, principal gênero é o *Saccharomyces*.

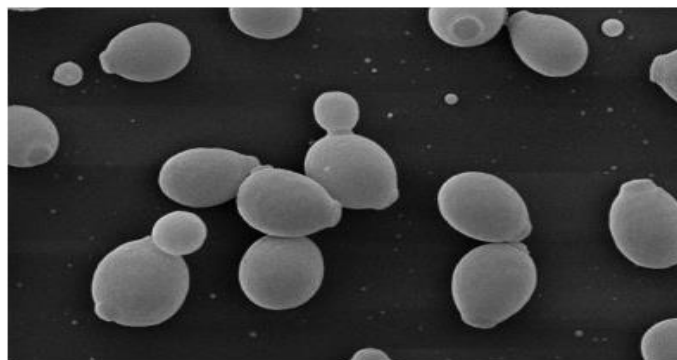


Figura 2. Leveduras em processo de multiplicação.
Fonte: (MADIGAN et al., 2010).

No processo fermentativo as leveduras convertem os açúcares (glicose e frutose) em etanol (Figura 3). O processo de conversão que ocorre dentro da célula é dividido em duas etapas: A primeira etapa é a conversão do monossacarídeo em ácido pirúvico (piruvato), isso acontece através de uma sequência de dez reações enzimáticas, esta etapa é conhecida como glicólise. A segunda etapa acontece a partir do ácido pirúvico, em condições de anaerobiose ocorre fermentação alcoólica propriamente dita, dando origem então ao produto final mais comum neste processo, o etanol (MADIGAN et al., 2010).

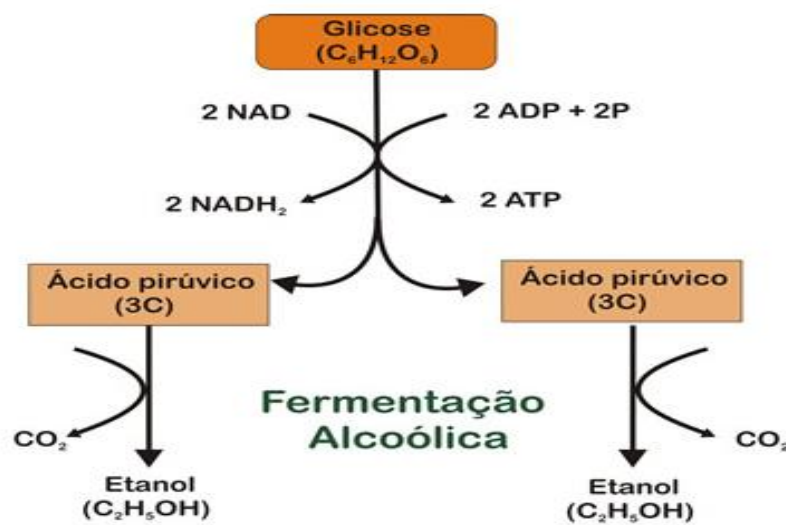


Figura 3. Conversão da Glicose em etanol pela ação das leveduras.

Fonte: (MADIGAN et al., 2010).

Na fermentação alcoólica de açúcares, por ação de leveduras, os principais produtos obtidos em proporções equimolares são o etanol e o dióxido de carbono (Figura 4). Esse mecanismo foi determinado pela primeira vez por Gay-Lussac, onde 100 g de glicose rendem 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac e é dado básico para cálculo de eficiência de conversão (JACMAN, 1991).

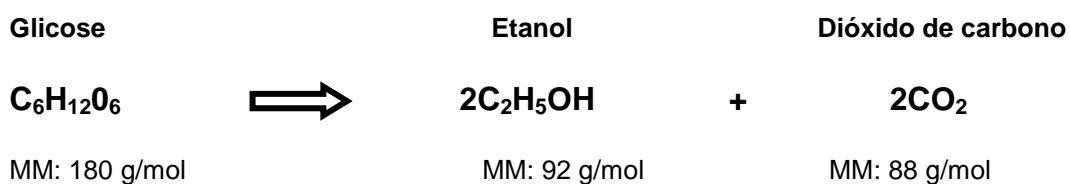


Figura 4. Conversão estequiométrica de glicose em etanol e dióxido de carbono (Equação de Gay-Lussac). (MM = Massa Molar). Fonte: (JACMAN, 1991).

O alto teor de açúcar do mel quando diluído para produção do hidromel, é fermentado pelas leveduras do gênero *Saccharomyces*. As leveduras utilizadas na produção de vinho de mel são geralmente as estirpes empregadas na produção de vinho, cerveja e champanhe (SCHULLER e CASAL, 2005).

Os atrasos e problemas nas fermentações, bem como a produção de *flavours* indesejados, são alguns dos problemas encontrados na produção de hidromel, normalmente associados com a incapacidade de resposta das leveduras para se adaptar às condições de *stress* desfavoráveis ao seu crescimento.

Uma condição de *stress* é qualquer fator ambiental que possa exercer um efeito adverso no crescimento celular (IVORRA et al., 1999). Alguns dos possíveis fatores de *stress* são: o choque térmico, as limitações de nutrientes essenciais, o *stress* osmótico, o *stress* oxidativo, a privação de nitrogênio e a toxicidade ao etanol (BAUER e PRETORIUS, 2000; HOHMANN e MAGER, 2003). As células devem detectar e responder a estes fatores para que a fermentação não seja afetada negativamente (ZUZUARREGUI e DEL OLMO, 2004).

A análise da resistência ao *stress* pode ser usada como critério para a seleção de leveduras enológicas, uma vez que existe uma relação entre o desempenho fermentativo das leveduras e a resistência a essas condições (ZUZUARREGUI e DEL OLMO, 2004). Numa fermentação alcoólica, procura-se também, uma produção reduzida de dióxido de enxofre, de espuma, de sulfureto de hidrogênio e de acidez volátil, bem como um bom perfil enzimático (atividades elevadas de β -glucosidase proteolítica), produção baixa de acetaldeído e ausência de produção de aminas biogênicas.

Como mencionado anteriormente, os baixos níveis de substâncias nitrogenadas e de minerais presentes no mel, indispensáveis para a multiplicação das leveduras e o pH ácido do caldo fermentativo afetam negativamente a evolução do processo. Assim, é vantajoso um controle rigoroso das condições de fermentação.

Dentre os nutrientes assimilados pelas leveduras durante a fermentação, os compostos nitrogenados são quantitativamente os mais importantes, depois dos compostos de carbono, pois são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (CASELLAS, 2005). A quantidade de nitrogênio disponível para as leveduras depende das fontes de nitrogênio assimilável presentes no mosto e da concentração de etanol, que afeta negativamente sua assimilação.

Um fornecimento inadequado de nitrogênio assimilável no meio de fermentação pode levar ao crescimento deficiente da levedura, a fermentações prolongadas, a taxas de crescimento reduzidas e conseqüentemente, a um decréscimo da produtividade.

Adicionalmente, a qualidade organoléptica do produto pode deteriorar-se devido ao catabolismo de aminoácidos e peptídeos causando a formação de sulfureto de hidrogênio (H₂S), de determinados ésteres e de padrões alterados de diacetil (O'CONNOR-COX e INGLEDEW, 1991). Os requisitos mínimos de nitrogênio são ditados pela taxa de crescimento da levedura desejada nesse meio.

Fermentação de hidromel é um processo demorado, que frequentemente leva vários meses para se completar, dependendo do tipo de mel, levedura e composição do mel (NAVRÁTIL et al., 2001). Um objetivo importante na produção de hidromel é reduzir o tempo de fermentação, sem diminuir a qualidade do seu produto final. Alguns estudos de otimização da produção de hidromel foram realizados, entre os quais, cita-se o estudo de Pereira et al. (2009) que conseguiram reduzir o período de fermentação de hidromel para cerca de oito dias, utilizando méis claros e escuros enriquecidos com dois suplementos contendo nitrogênio e fósforo.

Mendes-Ferreira et al. (2010) na busca por otimizar o preparo do mostro para produção de hidromel, preparam mosto a partir da diluição de mel com água potável em uma proporção de 37 g/100mL, a mistura homogeneizada apresentou 22,2 °Brix, o que tem potencial para se obter hidromel com aproximadamente 11% de álcool. Os autores avaliaram os parâmetros de pH, °Brix, acidez total e concentração de nitrogênio assimilável.

Os parâmetros foram ajustados pela adição de ácido málico, tartarato de potássio e fosfato de amônio em diferentes proporções. A taxa de inoculação foi de 10⁵ UFC/mL e temperatura de fermentação de 22 °C em ambiente anaeróbio. Nestas condições os autores conseguiram completar a fermentação do hidromel em 11 dias.

Mesmo sob condições melhoradas de processo fermentativo, os açúcares disponíveis não foram completamente consumidos pelas leveduras e certa quantidade de resíduo de nitrogênio assimilável permaneceu em todos os fermentados, mesmo em processos de controle (sem adição de suplemento). Além disso, a densidade celular nunca foi maior que 10⁷ células por mL, o que sugere que há algo no mel que inibe o crescimento de levedura.

Em outros estudos, demonstrou-se que um tempo significativo pode ser reduzido no processo de fermentação, aumentando a taxa de inoculação, no entanto, um aumento na taxa de inoculação também pode ter efeitos colaterais prejudiciais sobre o rendimento da fermentação ou sobre o perfil de sabor da bebida final (VERBELEN et al., 2009).

Além da qualidade da matéria prima, pH, temperatura, teor de açúcares e disponibilidade de nutrientes, a taxa de inoculação de leveduras é fundamental no processo de obtenção de hidromel.

A fim de determinar a melhor taxa de inoculação, Pereira et al. (2013) desenvolveram estudo para testar a produção de hidromel com diferentes taxas de inoculação utilizando de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 células por mL. Neste estudo, os autores concluíram que a taxa de inóculo não tem necessariamente impacto inversamente proporcional ao crescimento celular, ou seja, quanto a taxa de inoculação é maior não necessariamente o crescimento celular é menor. Todavia, o tempo de fermentação é significativamente menor quanto maior for a taxa de inoculação, e o sabor e aroma do produto final é diretamente afetado pela taxa de inoculação e pela estirpe da levedura.

3.6 Maturação do Hidromel

Dentre as especificidades do hidromel, o período de envelhecimento (maturação) e as condições de armazenagem podem conferir características singulares. A maturação ocorre geralmente em recipientes de vidro que lhe confere as características sensoriais (sabor agridoce e aroma picante) e físico-química do produto de fabrico tradicional (EU, 2012).

Os tipos de maturadores empregados podem contribuir para alteração da cor, aroma e sabor do hidromel tornando seus atributos sensoriais distintos, alterando, portanto a qualidade sensorial. Dentre os diversos tipos de maturadores comumente utilizados encontram-se os tonéis confeccionados de madeiras que conferem características particulares ao hidromel dependo da madeira utilizada qualidade (FARIA, 2000; LIMA, 1999).

Desta forma, o recipiente utilizado na maturação afeta diretamente as características da bebida, podendo remover ou adsorver algumas substâncias como flavonóides e taninos. Além disso, a decomposição parcial de macromoléculas da

madeira (lignina, celulose, hemicelulose) em monômeros solúveis, como aldeídos e ácidos carboxílicos são incorporados a bebida. Todas as transformações promovem aumento progressivo de coloração e viscosidade além do sabor no produto submetido ao envelhecimento (MAINIERI e CHIMELO, 1989).

Dentre as madeiras usualmente utilizadas para o envelhecimento de bebidas, o carvalho é mundialmente predominante (GONZÁLES-CENTENO et al., 2016). Contudo o Brasil existe uma grande disponibilidade de madeiras com possível potencial para substituição do carvalho, dentre elas podemos citar: bálsamo, jatobá, jequitibá, amburama e ipê.

O carvalho (*Quercus alba*) originário da América do Norte, tem sido o tipo de madeira preferido para confecção de barris e maturação de bebidas, este material possui porosidade adequada, transfere cor e extrato para a bebida e favorece o desenvolvimento de características sensoriais de boa qualidade (LIMA, 1999; FARIA, 2000).

O bálsamo (*Myroxylon balsamun (L.) Harms*), também conhecido por cabriúva-vermelha, óleo vermelho, pau-balsamo ou sangue de bálsamo, madeira nativa do Brasil, existente em vários estados brasileiros, também é bastante utilizada para confecção de barris para envelhecimento de bebidas, o qual apresenta resultados favoráveis em substituição ao carvalho (LORENZI, 1992; LIMA, 1999; TÉO et al., 2005). Esta madeira é caracterizada por apresentar cheiro característico balsâmico e agradável e seu gosto é levemente adstringente (MAINIERI e CHIMELO, 1989; TÉO et al., 2005).

Neste trabalho, barris de carvalho e bálsamo foram utilizados para a maturação do hidromel, a variação das características físico-químicas e principalmente a cor, serão acompanhados ao longo do tempo, com o intuito de avaliar a performance de cada madeira.

3.7 Consumo de Hidromel

O hidromel é uma bebida reconhecida como das mais antigas consumidas pelo homem, talvez mesmo antes do vinho e é provavelmente a precursora da cerveja (PEREIRA, 2008). O vinho do mel (hidromel) trata-se de uma bebida fermentada à base de mel, água e levedura, podendo ser adicionado ervas, especiarias e frutas.

O consumo de hidromel é bastante expressivo em alguns países, tais como Inglaterra, Polônia, Alemanha, Eslovênia e sobre tudo em países africanos, como a Etiópia e África do Sul. Em Portugal, o hidromel apenas é produzido de uma forma caseira (PEREIRA, 2008).

No Brasil, embora a produção de mel de abelhas africanizadas seja significativa contando ainda com incentivo do governo, a produção de hidromel é bastante modesta, pois grande parte da produção de mel é destinada a exportação (MATTIETTO, et al., 2006; BERRY, 2007).

Assim, a produção de hidromel e a diversificação desta bebida promovida pela etapa de maturação ocorrem com o intuito de aproveitar o mel dissipado durante a extração, agregar valor ao produto e complementar na renda familiar dos apicultores, bem como, apresentar ao consumidor uma nova opção de bebida fermentada, posto que, no Brasil e principalmente no Sudoeste do Paraná esta bebida é pouco conhecida e não está disponível comercialmente nos mercados.

3.8 Compostos voláteis no Hidromel

As características sensoriais do hidromel estão diretamente ligadas a sua composição de compostos voláteis, tais como: alcoóis, ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros. A presença e concentração destes compostos estão relacionadas com a qualidade da matéria prima, condições de fermentação e também a maturação (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

Atrasos no processo fermentativo relacionados ao estresse osmótico, falta de nutrientes essenciais ou em função de temperatura inadequada, podem gerar compostos e ou sabores indesejáveis, dando origem a um hidromel desagradável ao paladar, com sabor residual gerado pelas leveduras em função da incapacidade de adaptar-se ao meio (PEREIRA, 2009).

Cuidados especiais no preparo do mosto são essenciais para garantir uma fermentação sadia, livre de contaminação por bactérias que possuem capacidade de metabolizar os açúcares gerando ácidos carboxílicos, aumentando os níveis de acidez volátil da bebida e dando origem a ésteres anormais e indesejáveis (PEREIRA et al., 2009).

Os principais compostos voláteis que contribuem para a formação do aroma no hidromel são os ésteres. A Tabela 1 apresenta os principais ésteres avaliados neste trabalho, bem como suas características físico-químicas e sensorias.

Tabela 1. Características (Massa Molar e Temperatura) e aroma dos principais ésteres.

Nome do éster	MM (g/mol)	PE (°C)	Aroma
Acetato de etila	88,12	77,06	Solvente; Frutado; Abacaxi.
Butanoato de etila	116,16	121	Maçã; Banana; Doce; Frutado.
Hexanoato de etila	144,22	168	Banana; Abacaxi; Frutado; Maçã verde; Doce.
Octanoato de etila	172,27	208,5	Frutado; Banana; Abacaxi; Damasco; Vinho; Floral.
Nonanoato de etila	186,30	227	Frutado
Decanoato de etila	200,33	241,5	Maçã; Conhaque, Uva; Frutado
Dodecanoato de etila	228,38	269	Frutado; Floral

PE: Ponto de Ebulição; MM: Massa Molar.

Fonte: (FERREIRA, 1999; CROW, 2004; WEAST, 2006; PEREIRA, 2015)

3.8.1 Técnicas de Análise de compostos voláteis

Entre as diferentes técnicas utilizadas na determinação e análise de compostos voláteis, são relevantes: espectrofotometria uv/vis; espectrometria no Infravermelho, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e alguns métodos convencionais (não instrumentais) (HOLLER, 2009).

A cromatografia é um procedimento analítico bem estabelecido com uma história de uso de várias décadas. Constitui um método que vem sendo continuamente aperfeiçoado através de suas novas variantes e modificações dos procedimentos.

Uma definição geral estabelecida por um comitê especial da União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*), considera a cromatografia como:

“...um método, usado primariamente para separação dos componentes de uma amostra, no qual os componentes são distribuídos entre duas fases, sendo uma delas estacionária, enquanto a outra se move. A fase estacionária pode ser um sólido,

um líquido sobre um suporte, ou um gel. A fase estacionária pode ser acondicionada em uma coluna, espalhada como uma camada, ou distribuída como um filme... A fase móvel pode ser gasosa ou líquida” (IUPAC, 2015).

Sendo a cromatografia um método de separação, os cromatógrafos são acoplados detectores para que seja possível a identificação e quantificação das substâncias, existem diversos tipos de detectores, porém no presente estudo foram utilizados, o detector de Massas acoplado e o detector de Ionização de chama (FID).

A cromatografia de fase móvel gasosa acoplada a um detector de massa (CG-MS) apresenta-se como uma poderosa ferramenta na identificação de compostos voláteis de uma amostra. O MS é capaz de determinar a massa do íon molecular e a massa dos fragmentos do composto a ser identificado, um determinado composto apresenta padrão de fragmentação característico. A partir da massa do íon molecular, número e massa dos fragmentos é possível identificar o composto baseando-se em uma biblioteca incorporada no próprio software do equipamento (HOLLER, 2009; HARRIS, 2008).

O detector tipo FID (ionização por chama), é um método destrutivo, o detector é dotado de uma chama de H₂ ar sintético, uma vez que o composto ao atinge a chama é ionizado e os íons geram um pulso elétrico convertido em pico no cromatograma (HARRIS, 2008).

O procedimento de análise é preciso e relativamente rápido, porém, os procedimentos de preparo da amostra são complexos, demandando trabalho e tempo, sendo, em alguns casos são ineficazes (HOLLER, 2009). No intuito de aperfeiçoar técnicas de preparo de amostras, reduzir o consumo de reagentes e ganhar tempo surge, no meio científico, uma alternativa moderna à tecnologia tradicional da preparação da amostra, a denominada microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction* - SPME). Esta técnica é um método da extração desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores no ano de 1989.

A técnica SPME elimina o uso de solventes (tóxicos) orgânicos, e diminui substancialmente o tempo de análise ao permitir uma automatização conveniente da preparação da amostra. Pode integrar a amostragem, a extração, a concentração e a introdução da amostra em um único processo ininterrupto (MORÉS, 2009).

Além disso, apresenta características consideradas importantes como: simplicidade, custo baixo, rapidez, seletividade e sensibilidade quando combinadas com as modalidades apropriadas de detecção podendo ser usado como um estágio

prévio da preparação da amostra, não somente na cromatografia a gás, mas na cromatografia líquida e na eletroforese capilar (MORÉS, 2009). A Figura 5 apresenta esquema de extração de analitos via SPME.

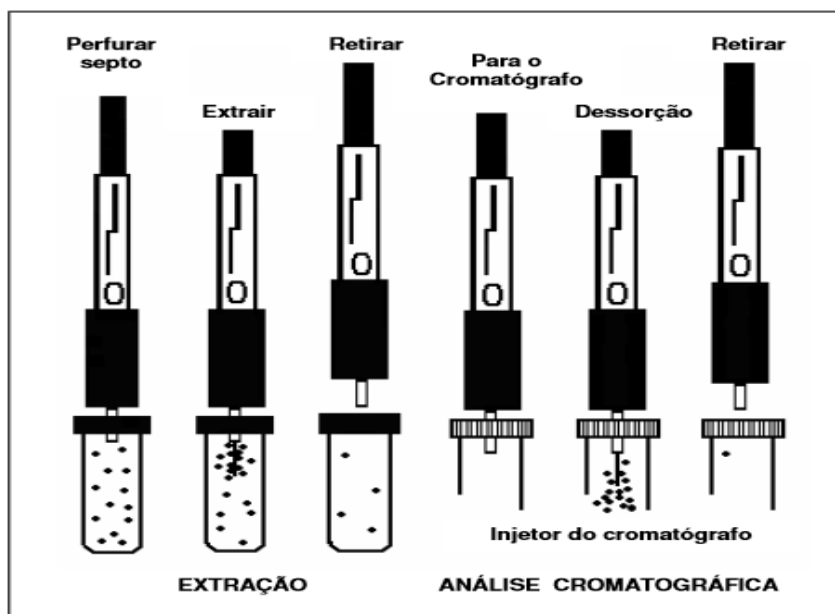


Figura 5. Uso do SPME, para extração e dessorção de analitos para posterior análise em GC.

Fonte: (MORÉS, 2009).

3.9 Colorimetria

A cor é um dos principais atributos físicos dos alimentos e pode ser fator decisivo para preferéncia do consumidor (KEMPKA e MANTOVANI, 2013).

A cor enquanto parâmetro físico pode ser definido como a distribuição de energia da luz transmitida e refletida por um alimento, a cor pode ser distribuída em um espectro eletromagnético contínuo que pode ser medido por método instrumental, utilizando-se de um colorímetro (JIMÉNEZ e GUTIÉRREZ, 2001).

Através do método instrumental, podemos obter três valores representados no diagrama tridimensional (Figura 6), podendo definir a coloração do produto. Conhecido como sistema CIELAB, (1976), define os parâmetros de cor da seguinte maneira: L^* mede a variação da luminosidade entre o preto (0) e o branco (100), a^* é uma coordenada da cromaticidade, define a cor vermelha para valores positivos e cor verde para valores negativos, b^* também é uma coordenada de cromaticidade, define a cor amarela para valores positivos e cor azul para valores negativos, o

método traz ainda a variável C^* (saturação de cor) e h^* (tonalidade) (MINOLTA, 1994).

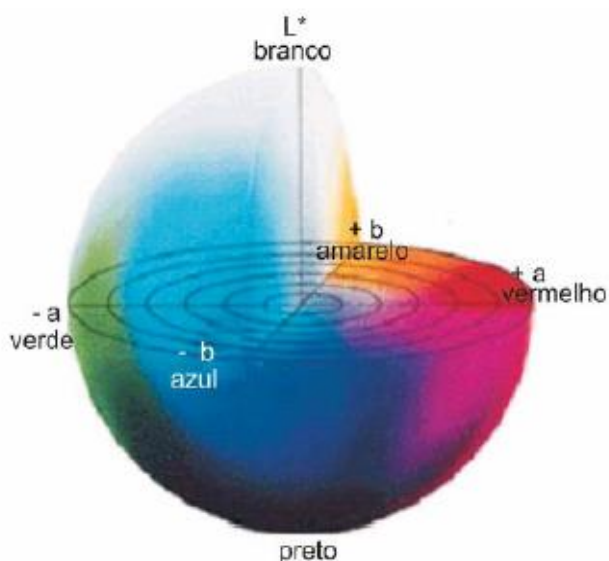


Figura 6 – Diagrama de cores para análise no colorímetro.
Fonte: (MINOLTA, 1994).

3.10 Análise Sensorial

O desenvolvimento de produtos está estreitamente relacionado com as necessidades e tendências de consumo da população consumidora. Porém, paralelamente a essas tendências estão os atributos sensoriais de um produto, como sabor, cor e textura. Visando avaliar a interação de todas essas características desejáveis em um produto, a indústria de alimentos faz uso de uma ferramenta fundamental que é capaz de indicar aspectos relevantes no alcance do sucesso de um produto alimentício e no controle de qualidade do mesmo: a análise sensorial de alimentos. Por isso, grande parte das decisões das indústrias de alimentos se baseiam nas respostas obtidas nesse tipo de análise, utilizada não somente no desenvolvimento de novos produtos, mas também para modificação de produtos já existentes, na otimização de processos, redução de custos, vida útil e pesquisa de mercado (QUEIROZ e TREPTOW, 2006).

Segundo Lawless e Claasem (1993), a escolha de um método de análise sensorial para desenvolvimento de um produto depende da resposta de pelo menos uma das questões fundamentais:

- 1 – O produto possui aceitação pelos consumidores?

2 – Existe diferença sensorial perceptível entre um novo produto e um produto convencional similar? Dois produtos podem ser diferentes, mas igualmente aceitos?

3 – Quais os principais pontos de diferença? (Que qualidades sensoriais estão presentes? Quais as suas intensidades?).

As respostas a essas três questões gerais permitem classificar os métodos sensoriais em testes de aceitação, para responder a primeira pergunta; testes discriminativos (ou de diferença) para a segunda; e análise descritiva, para terceira.

As análises do tipo discriminativas e descritivas exigem que os testes sejam realizados por julgadores treinados.

Para se obter a medida da reação de preferência do consumidor sobre determinada amostra em relação a outra, há necessidade de um grande número de julgadores. Não se deve ter menos de 50 respostas para preferência e 100 respostas independentes para aceitabilidade, quando o teste for realizado em laboratório. Nesse caso, há interesse em que os julgadores sejam não treinados, estabelecendo-se o perfil da população testada (DUTCOSKY, 2007).

Dentre os métodos subjetivos, aqueles que expressam a opinião pessoal do julgador, são relevantes: comparação pareada, ordenação, escala hedônica e escala de atitude.

A escala hedônica que avalia o quanto o julgador gostou ou desgostou de uma determinada amostra, é largamente utilizada, desde que foi desenvolvida por Peryam e Pilgrim (1957), para análise de preferência e aceitabilidade dos consumidores, aplicada a um público-alvo definido. A forma geral da escala é:

- 1 – Desgostei extremamente
- 2 – Desgostei muito
- 3 – Desgostei moderadamente
- 4 – Desgostei ligeiramente
- 5 – Indiferente
- 6 – Gostei ligeiramente
- 7 – Gostei moderadamente
- 8 – Gostei muito
- 9 – Gostei extremamente

A escala hedônica pode ser utilizada em testes de aceitação em laboratório, obtendo informações acerca da provável aceitação de produtos pelo consumidor. Através dessa metodologia, pode-se determinar a aceitação quando forem feitas

alterações ou inclusão de ingredientes em um produto alimentício. Modificações nos processos ou condições de estocagem, por exemplo, também podem ser avaliadas por esse teste sendo que, para um estudo representativo, faz-se necessária a participação de 100 julgadores na avaliação das amostras (CHAVES e SPROESSER, 2002).

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As leveduras e tonéis (maturadores) foram adquiridos em comércio especializado nestes produtos. O mel polifloral de (*Apis mellifera*) foi adquirido na associação dos apicultores de Francisco Beltrão - Paraná de um único produtor, de modo a garantir a homogeneidade da matéria prima.

Foram adquiridas e testadas três diferentes cepas de leveduras para a produção de hidromel, sendo que as demais variáveis do processo como a taxa de inoculação, o teor de sacarídeos do mosto, a adição de nutrientes, a temperatura de fermentação e a disponibilidade de oxigênio foram mantidas constantes.

As leveduras utilizadas para produção da bebida foram: a levedura da marca *Fleischmann*, pela disponibilidade e preço acessível; a levedura da marca *Red Star*, tipo *Pasteur Champagne*, por ser largamente utilizada na produção de champagne e hidromel e resistir a altos níveis de teor alcoólico (>16%) e a levedura da marca *Lalvin* tipo *EC 1118*, por ser amplamente utilizada na produção de hidromel.

Durante o processo de fermentação foram avaliados periodicamente o pH e a variação do °Brix do mosto a fim de acompanhar a progressão do processo fermentativo. A contagem de leveduras foi realizada no início e ao término da fermentação a fim de avaliar o crescimento celular.

As bebidas produzidas com as três diferentes cepas de leveduras foram submetidas à caracterização físico-química, compostos voláteis foram identificados e quantificados por cromatografia, as amostras foram submetidas à análise sensorial. A amostra que obteve o melhor desempenho na análise sensorial (bebida produzida pela cepa *Fleischmann*), foi submetida ao processo de maturação em barris de bálsamo e carvalho e as características físico-químicas das bebidas foram avaliadas em diferentes tempos de maturação (30 dias, 60 dias, 90 dias, 120 dias e 180 dias).

4.2 Caracterização físico-químicas do mel

A caracterização físico-química do mel foi realizada segundo metodologias oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005), da *Codex*

Alimentarius Commission (CAC, 2011) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e encontram-se descritas a abaixo.

4.2.1 Umidade/Sólidos solúveis

A umidade do mel foi determinada, segundo a *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011), utilizando-se um refratômetro de Abbe. A leitura do índice de refração foi transformada em umidade de acordo com a tabela de Chataway. Faz-se, então, a correção da temperatura para 20 °C.

4.2.2 Cinzas

O teor de cinzas do mel foi determinado pela incineração em mufla a 550 °C, segundo o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.2.3 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores (glicose e frutose) no mel foi realizada volumetricamente e baseada no método de Lane e Eynon, segundo o *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011) utilizando reagentes de *Fehling A* e *B*.

4.2.4 Sacarose aparente

A determinação de sacarose aparente foi realizada volumetricamente segundo procedimento do *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011) Após a hidrólise ácida dos dissacarídeos da amostra.

4.2.5 Acidez

Para determinação do grau de acidez nas formas de acidez livre e acidez lactônica, foi utilizado o método volumétrico, conforme descrito no método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

4.2.6 Hidroximetilfurfural

A determinação do hidroximetilfurfural foi realizada por meio do espectrofotômetro UV/VIS a 284 e 336 nm, conforme método estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

4.2.7 pH

Medições do pH foram realizadas com auxílio de pHmetro devidamente calibrado de acordo com o IAL (2008).

4.3 Testes de adulteração do mel

Para identificar possíveis adulterações e fraudes no mel (matéria prima para produção do hidromel) foram realizados os testes de Reação de *Fiehe*; Reação de Lugol e Reação de *Lund* (IAL, 2008).

4.4 Produção do hidromel

4.4.1 Preparo do inóculo

As diferentes leveduras (desidratadas) foram preparadas (*starting*) de acordo com as instruções de cada fornecedor pela incorporação de água a temperatura aproximada de 35 °C. Após aproximadamente 2 horas, fora fornecido sacarídeos (10% de glicose/frutose) e ajustada a temperatura para 30 °C e posteriormente fermentada em *shaker*.

Após fermentação foi realizada a contagem de células viáveis através de câmara de *Neubauer*, utilizando azul de metileno como corante (ANTONINI, 2004; LUCARINI et al., 2004).

4.4.2 Preparo do mosto

O volume total de mosto preparado foi de 40 litros, com 27 °Brix. Foi preparado a partir de mel de abelha comercial (*Apis mellífera*) de 80 °Brix, diluído

com água estéril e suplementado com fosfato de amônio dibásico na proporção de 25 g/hL. O pH foi corrigido para 4,0 com ácido cítrico 1,0 mol/L, o mosto foi previamente aerado com ar estéril por 1 hora e fracionado em três partes de 13,3 litros, a taxa de inoculação foi na ordem de 10^5 células viáveis por mL de mosto, nos três fermentadores.

4.4.3 Fermentação

A fermentação foi conduzida em fermentadores de polipropileno com volume total de 20 litros, o sistema foi mantido em anaerobiose e em temperatura constante de 25 °C, o processo de fermentação foi acompanhado através de medições de índices de refração e pH.

O cessar do desprendimento de gás carbônico seguido da estabilização do índice de refração, bem como, parada no consumo de açúcares indicou o final do processo de fermentação.

O fermentado foi clarificado através de refrigeração e trasfega, depois da devida clarificação a bebida foi engarrafada ou acondicionada em tonéis de madeira para maturação.

4.4.4 Maturação do hidromel

Dentre os hidroméis produzidos com diferentes cepas de leveduras, o que obteve melhor desempenho na análise sensorial (*Fleischmann*), foi submetido ao processo de maturação realizado em toneis com volume de 10 litros, construídos de diferentes madeiras (Carvalho e Bálamo). Foram coletadas amostras ao longo do tempo para avaliar a variação das características físico-químicas, os tempos de maturação foram: 30 dias, 60 dias, 90 dias, 120 dias e 180 dias, as amostras maturadas foram comparadas entre si e com o hidromel fresco.

4.5 Caracterização físico-química do hidromel

As análises dos parâmetros físico-químicos do hidromel durante o período de maturação foram realizadas segundo metodologias oficiais da *Association of Official*

Analytical Chemists (AOAC, 2005), da *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.1 Densidade relativa

Foi realizada a 20 °C utilizando balança analítica e picnômetro de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.2 Teor alcoólico real

O etanol formado durante a fermentação foi quantificado de acordo com o método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). A amostra foi parcialmente destilada e ajustado seu volume em com água destilada de acordo com volume inicial, a densidade foi medida utilizando picnômetro a 20 °C, a densidade foi convertida através de valores tabelados para teor alcoólico em porcentagem (%).

4.5.3 Extrato seco

Este método foi aplicado a amostras de bebidas alcoólicas e baseia-se na pesagem do resíduo após a evaporação da água e álcool por aquecimento, de acordo com Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.4 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada de acordo com o método modificado de *Lane e Eynon*, segundo o *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011).

4.5.5 Acidez total, fixa e volátil

Foi determinada volumetricamente pela titulação com NaOH 0,1 molL⁻¹ padronizado, de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.6 Identificação e quantificação de compostos voláteis

As análises dos compostos voláteis do hidromel foram realizadas por CG-MS e microextração em fase sólida (SPME), baseada na metodologia desenvolvida por Morés (2009). Para isso, foi utilizado um dispositivo suporte da fibra (*holder*), fibra, *vial* hermeticamente fechado com um septo (silicone ou teflon). O procedimento de SPME consta de duas etapas principais: uma etapa de extração do analito e uma de dessorção do analito. A etapa de extração foi realizada mediante utilização de *headspace* (HS/SPME): Neste caso, a fibra foi exposta na fase gasosa, dentro do *vial*, acima da amostra, por 15 minutos a 25 °C. Os analitos passam para a fase gasosa em função de suas pressões de vapor e são adsorvidos pela fibra. A etapa de dessorção ocorre mediante aquecimento (dessorção térmica), quando se acopla SPME a um cromatógrafo a gás. A fibra SPME (Fiber Assembly 100µm PDMS, Fused Silica 24 Ga, manual holder) foi inserida no injetor que se encontra em temperatura suficientemente alta para que, rapidamente, ocorra a dessorção.

O cromatógrafo utilizado para a identificação dos compostos foi da marca Shimadzu GC 2010, equipado com injetor *Split/splitless* e detector de massas. Coluna capilar Rtx-5 Restec (USA), com 30 m, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de fase estacionária.

O modo de injeção foi *Splitless*, temperatura do injetor foi de 270 °C, a temperatura inicial da coluna de 35 °C nos primeiros 3 minutos, na sequência a temperatura passou para 150 °C numa razão de 5 °C por minuto, atingindo 150 °C o aquecimento continuou até atingir 270 °C, numa razão de 15 °C por minuto, a temperatura de 270 °C foi mantida por 2 minutos, com vazão do gás de arraste (hélio 5.0) de 1,21 mL Min⁻¹, o detector operou no modo varredura total (15 a 400 u) e com elétron ionização a (70 eV), tempo total de corrida foi de 36 minutos.

Para a quantificação dos compostos voláteis foi aplicada a técnica de padronização externa em que, as curvas de calibração foram obtidas a partir da diluição de padrões analíticos (Sigma Aldrich) de cada composto identificado.

Para quantificação dos compostos voláteis utilizou-se um Cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu GC 2010, equipado com injetor *Split/splitless* com detector de ionização de chama (280 °C). As demais condições analíticas foram as mesmas que as utilizadas na identificação dos compostos.

A Tabela 2 apresenta as equações das retas, coeficientes de correlação e faixas de concentrações da quantificação dos compostos voláteis. As curvas de

calibração de cada composto quantificado encontram-se apresentadas no Apêndice E.

Tabela 2. Dados relativos a quantificação dos compostos voláteis.

Composto	Equação	Coefficiente de correlação - R²	Faixa de concentração em mg/L
Acetato de etila	$y = 5351,3x + 1398,8$	0,9987	10 - 125
3 Metil 1 butanol	$y = 1933x + 12850$	0,9993	50 - 625
2 Metil 1 Butanol	$y = 3248,2x - 9235,2$	0,9980	10 - 125
Butanoato de etila	$y = 79515x + 1129,8$	0,9991	0,1 - 5
Acetato de isoamila	$y = 247172x - 373,72$	0,9994	0,1 - 5
Hexanoato de etila	$y = 920262x + 26249$	0,9984	0,1 - 5
Álcool fenil etílico	$y = 91283x + 15083$	0,9975	0,1 - 5
Octanoato de etila	$y = 7E+06x - 436571$	0,9967	0,1 - 5
Fenil etil acetato	$y = 148443x - 17495$	0,9960	0,1 - 5
Acetato de fenil etila	$y = 129697x - 12200$	0,9953	0,1 - 5
Nonanoato de etila	$y = 1E+07x + 446256$	0,9919	0,1 - 5
Decanoato de etila	$y = 6E+06x + 2E+06$	0,9897	0,1 - 5
Dodecanoato de etila	$y = 487050x + 63511$	0,9974	0,1 - 5

4.6 Determinação de cor

A determinação da cor foi realizada utilizando-se de colorímetro da marca KONIKA MINOLTA, modelo Chroma Meter CR-400, as amostras foram acondicionadas em placa de petri, até atingir altura de 25 mm, utilizou-se fundo branco para evitar interferências, as medidas foram realizadas em triplicata com colorímetro devidamente calibrado.

4.7 Análise sensorial

Para realização da análise sensorial, foram recrutados de forma aleatória 112 provadores não treinados. As avaliações foram realizadas no laboratório de análise sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus de Francisco

Beltrão. Todas as amostras foram servidas geladas. As amostras de hidromel foram servidas em copos de vidro transparente de volume máximo de 25 mL, sendo fornecido aos provadores um copo com água para enxágue da boca a fim de limpar o palato entre cada amostra. A análise sensorial foi realizada com as três diferentes amostras de hidromel com o intuito de avaliar qual seria a preferida e mais aceita pelos consumidores. Neste sentido, o estudo foi planejado de modo que cada participante avaliasse os atributos sensoriais das amostras. Foram comparadas as três amostras de hidromel e avaliados os atributos aparência, cor, aroma e sabor.

Cada amostra foi avaliada individualmente por cada julgador sobre uma escala hedônica de 1 a 9 pontos para os atributos cor, aroma e sabor, sendo o valor 9: Gostei muitíssimo e o valor 1: Desgostei muitíssimo. Foi solicitado ao avaliador que apontasse a amostra de sua preferência, e fale sobre sua intenção de compra (Apêndice A).

4.8 Tratamento de dados

Para verificar as suposições de normalidade e homogeneidade de variâncias foram utilizados os testes de Shapiro Wilk e Levene, ambos com 5% de significância.

A análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey foram utilizados para verificar se os efeitos dos diferentes tratamentos foram significativos, considerando 95% de confiabilidade, os testes foram realizados através de software Statistica versão 7.0 (STATSOFT INC, 2004).

Quanto aos dados obtidos através da análise sensorial, estes dados não apresentaram distribuição normal, tentativas de transformação para obter normalidade não apresentaram sucesso, portanto, para tratamento estatístico destes dados foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, através do software “*Action*” suplemento do Microsoft Excel 2010.

Os dados obtidos através da análise sensorial foram ainda submetidos a análise estatística “Multivariada” (análise de componentes principais) através do software “XLSTAT”, suplemento do Microsoft Excel 2010.

4.9 Aspectos éticos

O envolvimento de seres humanos na pesquisa ficou restrito a análise sensorial das bebidas. Menores de 18 anos e pessoas que possuem restrições ao

consumo de bebidas alcoólicas, mel ou derivados de mel foram orientados a não participar. O volume de bebida oferecido ao provador não treinado não foi superior a 25 mL por amostra, a análise foi realizada mediante o conhecimento e aceitação dos termos constantes no “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice B). O projeto foi submetido ao comitê de ética sob o protocolo nº 35293414.2.0000.5227 e devidamente aprovado de acordo com o parecer substanciado nº 968.053 (Apêndice C).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do mel

A caracterização físico-química e análises de adulteração do mel fornecem um conhecimento prévio do teor de açúcares e a pureza da matéria prima. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na caracterização físico-química do mel de abelhas (*Apis mellífera*) que foi utilizado como matéria prima na produção das bebidas.

Tabela 3. Caracterização físico-química do mel utilizado no na produção do hidromel.

Parâmetros	Resultados	Padrão de qualidade do mel
Teor de sólidos (%)	81,53 ± 0,23	NA
Umidade (%)	18,40 ± 0,20	< 20
Cinzas (%)	0,22 ± 0,01	< 0,6
Açúcares redutores (gramas/100g)	74,63 ± 0,01	> 65
Sacarose aparente (gramas/100g)	1,05 ± 0,01	< 6
Acidez livre (meq./Kg)	33,51 ± 0,60	< 50
Acidez lactônica (meq./Kg)	5,03 ± 1,38	NA
HMF (mg/Kg)	5,03 ± 1,38	< 60
pH (adimensional)	4,44 ± 0,01	NA
Sólidos insolúveis (%)	0,03 ± 0,01	< 0,1

Os valores são médias dos resultados em triplicata, acompanhado do seu respectivo desvio padrão. O padrão de qualidade refere-se a IN MAPA n° 11/2000 (BRASIL, 2000), que determina os limites mínimos ou máximos para cada parâmetro. Sendo NA, não se aplica.

Os resultados demonstram que o mel utilizado como matéria prima para o desenvolvimento do estudo, apresentou padrão de qualidade e identidade característico do mel puro de abelhas (*Apis mellífera*) e, ao mesmo tempo obedece aos limites estabelecidos pela Instrução Normativa número 11/2000 emitida pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000).

O teor de umidade está diretamente relacionado com a qualidade do mel, o que foi comprovado para a amostra analisada no presente estudo, que também se encontra dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). Em estudo realizado por Sereia et al. (2011), os índices de umidade de mel orgânico, de ilhas de tríplice fronteira (entre Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul) e do

Estado do Paraná, variaram de (23,50% a 24,40%), valores estes, superiores ao preconizado pela legislação (BRASIL, 2000) e também superiores aos encontrados no presente estudo (18,40%).

O teor de açúcares redutores é uma informação fundamental para que o mosto possa se preparado de forma correta, pois, serão os açúcares redutores que serão convertidos em álcool através da ação das leveduras.

Em função do alto valor comercial e dificuldade da produção do mel, este, tende muitas vezes ser alvo de recorrentes tentativas de fraudes e adulteração, sendo que as adulterações mais comuns e recorrentes ocorrem pela adição de xaropes com baixo custo comercial, neste sentido, testes adicionais foram realizados para comprovar a pureza e procedência do mel utilizado (Tabela 4).

Tabela 4. Testes de adulteração (fraude) na amostra de mel utilizado na produção do hidromel.

Testes	Resultados
Glicose comercial Fiehe	Negativo
Glicose comercial Lugol	Negativo
Teste de adulteração de Lund	Negativo

Os testes foram realizados em triplicata.

Os testes comprovam a não adulteração do mel por parte dos produtores, sendo que o teste de *Fiehe* demonstrou a ausência de glicose comercial, o teste de *Lugol* apresentou resultado negativo para adulteração do mel com xaropes contendo dextrinas e amido, e a reação a reação de *Lund*, que avalia o teor de substâncias albuminoides que devem estar presentes no mel puro, também apresentou resultado negativo para adulteração.

5.2 Processo Fermentativo

Comprovado a qualidade da matéria prima (mel), realizou-se o acompanhamento da evolução do processo fermentativo das três diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, que foram selecionadas e utilizadas para a produção do hidromel (Figura 7).

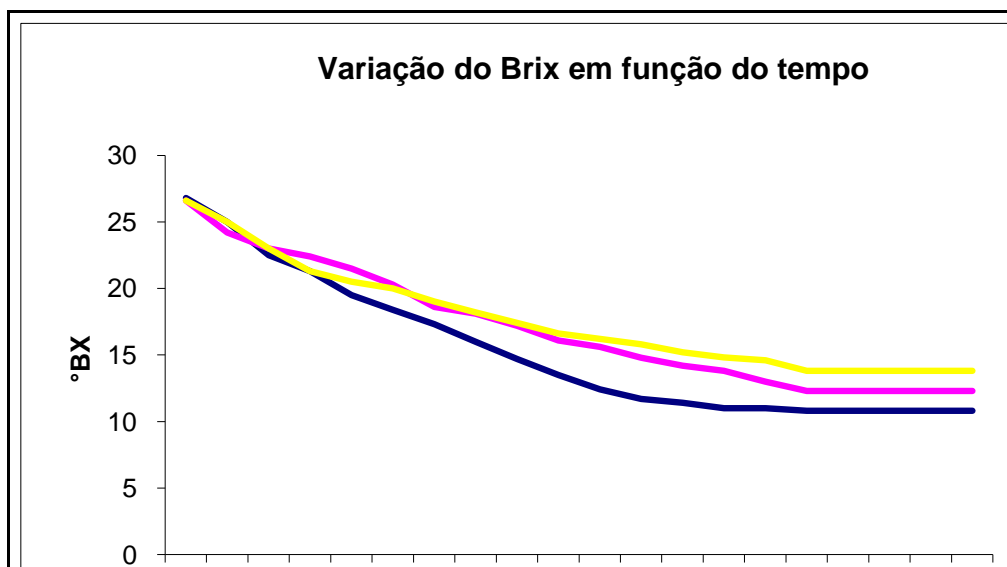


Figura 7: Variação do °Brix (consumo de substrato) ao longo do tempo.

Leveduras selecionadas são aquelas cepas induzidas a operar e se reproduzir em condições de estresse, seja este causado pelo alto teor de substrato, temperatura não ideal, elevados níveis de metabólito (álcool), e/ou outros, (PEREIRA et al., 2009). Além disso, devem possuir alta capacidade de conversão de açúcar em álcool.

Pela evolução do processo fermentativo pelas diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, observou-se que no quinto dia, a cepa *Red Star champagne* demonstrou maior potencial de transformação do açúcar em etanol, ou seja, capacidade superior às demais de adaptação à condição adversa de fermentação caracterizada pelo alto nível de substrato.

Diferentemente, as cepas de *Lalvin EC 1118* e *Fleischmann* só começaram a demonstrar comportamento diferenciado entre si após o décimo primeiro dia, isso provavelmente ocorreu em função de outra condição de estresse, provocada pelo teor de metabólito (teor alcoólico). Nestas condições, a cepa *Lalvin EC 1118* demonstra estar mais bem adaptada, entretanto, esta característica foi mais marcante na cepa *Red Star champagne*, que demonstra maior adaptação a essa condição se comparada com as demais cepas de leveduras utilizadas.

O processo fermentativo foi estabilizado a partir do décimo sétimo dia, indicando que possivelmente as leveduras atingiram sua capacidade máxima de tolerância aos níveis de álcool contido no fermentado. Isso foi reforçado pela análise dos resultados de caracterização das bebidas que demonstram que todas ainda dispõem de açúcar fermentescível após a estabilização do processo fermentativo.

Leveduras possuem certa limitação no processo de conversão de açúcares em álcool, isto é uma consequência dos níveis do produto (álcool) gerado nesse processo, mesmo leveduras selecionadas não são capazes de continuar o processo quando os níveis de álcool atingem valores próximos a 18% v/v. As cepas de leveduras são selecionadas conforme o tipo de substrato a ser fermentado (PEREIRA et al., 2009).

Além da qualidade da matéria prima, pH, temperatura, teor de açúcares e disponibilidade de nutrientes, a taxa de inoculação de leveduras é fundamental no processo de obtenção de hidromel (PEREIRA et al., 2013). Para acompanhamento desta importante variável, foi realizada a contagem e ajuste inicial do inóculo, bem como a determinação do número de leveduras viáveis ao final da fermentação para determinação da taxa de crescimento (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de inoculação, contagem após fermentação e taxa de crescimento das leveduras.

Parâmetros	<i>Red Star champagne</i>	<i>Lalvin EC 1118</i>	<i>Fleischmann</i>
Taxa de inoculação inicial	$10^5 \pm 155^a$	$10^5 \pm 132^a$	$10^5 \pm 142^a$
Contagem final	$4,8 \times 10^6 \pm 1614^a$	$8,61 \times 10^6 \pm 1178^b$	$1,32 \times 10^7 \pm 1919^c$
Taxa de crescimento*	48,00	86,10	132,00

* Número de vezes a taxa de inoculação. Os resultados representam médias das determinações em triplicatas, seguidos do desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$). (Análise de variância - ANOVA e Teste de Tukey).

Os resultados para crescimento celular foram coerentes com o rendimento, a cepa que apresentou o maior crescimento (*Fleischmann*), foi que apresentou o menor rendimento. Pereira et al. (2013), relata que o crescimento celular tem impacto direto sobre o rendimento uma vez que o substrato foi parcialmente consumido para que fosse possível o crescimento, reduzindo desta forma o rendimento. A cepa *Fleischmann* apresentou maior taxa de crescimento (132 vezes o valor inicial) e conseqüentemente o menor rendimento (45,93%) (Tabela 6).

Este comportamento diferenciado para taxa de crescimento está diretamente relacionado com o processo de seleção a qual as diferentes cepas foram submetidas (PEREIRA et al., 2009).

A Figura 8 apresenta a câmara de Neubauer e imagem microscópica da contagem de células viáveis.

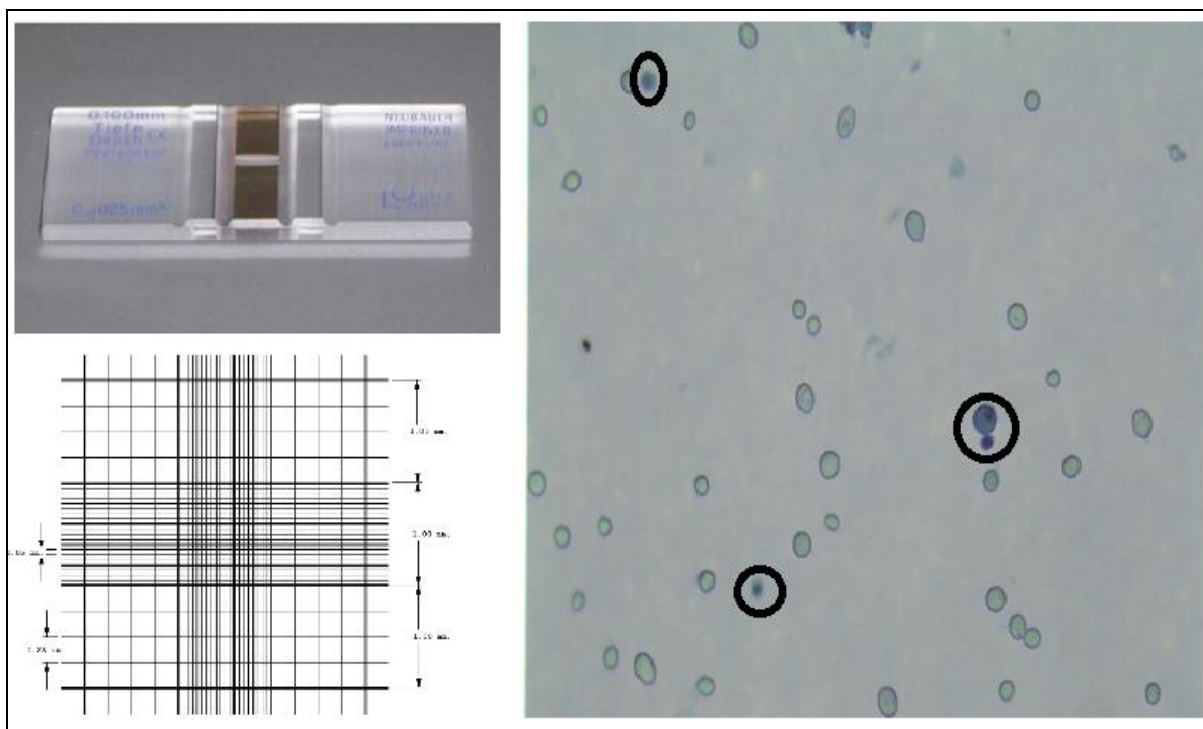


Figura 8. Parte superior esquerda câmara de *Newbauer*, inferior esquerda área demarcada da câmara, imagem a direita demonstra as células na câmara, as leveduras circulasdas são consideradas inativas, pois, admitem o corante para dentro da célula.

5.3 Caracterização físico-química do hidromel fresco produzido com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*

A caracterização físico-química de bebidas fermentadas é fundamental para a determinação de sua identidade e qualidade, os principais parâmetros são: densidade, teor alcoólico, acidez total e volátil e açúcares redutores.

A densidade das bebidas está diretamente relacionada com o consumo de substrato e produção de álcool, pois, o consumo de glicídios diminui o teor de sólidos dissolvidos e conseqüentemente diminui a densidade. Ao mesmo tempo, a produção de etanol também contribui para diminuição da densidade do fermentado (GOMES, 2010).

Os resultados das determinações físico-químicas (Tabela 6) corroboram com as informações demonstradas na Figura 7, principalmente no que se refere ao consumo de substrato (aproveitamento) e conseqüente produção de etanol. Extrato seco e açúcares redutores também apresentam valores coerentes, uma vez que a cepa que apresentou o maior rendimento e aproveitamento (*Red Star Champagne*), também apresentou menores níveis de extrato seco e açúcares redutores.

Tabela 6. Caracterização físico-química dos hidroméis produzidos com as diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*.

Parâmetros	<i>Red Star champagne</i>	<i>Lalvin EC 1118</i>	<i>Fleischmann</i>
Densidade (g.mL ⁻¹)	1,0006 ± 0,0001 ^a	1,0034 ± 0,0002 ^b	1,0053 ± 0,0002 ^c
Teor alcoólico (% v/v)	17,16 ± 0,06 ^c	15,52 ± 0,05 ^b	14,39 ± 0,09 ^a
Acidez total (meq.L ⁻¹)	53,66 ± 1,52 ^a	66,66 ± 0,57 ^b	65,00 ± 1,00 ^b
Acidez volátil (meq.L ⁻¹)	11,33 ± 0,57 ^b	14,66 ± 0,57 ^c	9,00 ± 1,00 ^a
Açúcares redutores (g.L ⁻¹)	19,63 ± 0,35 ^a	26,23 ± 0,23 ^b	43,16 ± 0,57 ^c
Extrato seco (g.L ⁻¹)	59,97 ± 0,11 ^a	64,25 ± 0,16 ^b	85,22 ± 0,39 ^c
Aproveitamento (%)	93,22 ± 0,12 ^c	90,95 ± 0,08 ^b	82,48 ± 0,47 ^a
Rendimento (%)	47,71 ± 0,17 ^c	46,32 ± 0,03 ^b	45,93 ± 0,11 ^a

Os resultados representados referem-se a médias das determinações em triplicatas, seguidos do respectivo desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem entre si (p>0,05). (Análise de variância - ANOVA e Teste de Tukey).

Foi possível constatar que os valores de densidade corroboram com os dados obtidos para teor alcoólico real, açúcares redutores, extrato seco e aproveitamento. Evidencia-se, também, por meio destes resultados, a maior capacidade da cepa *Red Star champagne* em processar substrato e transformá-lo em produto (álcool).

A cepa de leveduras *Lalvin EC 1118* apresenta condição intermediária, seguida pela cepa *Fleischmann*, no que diz respeito à capacidade de converter o substrato (açúcar) em produto (etanol), indicando menor capacidade de produção de álcool. Este fato pode estar, relacionado, possivelmente, ao processo de seleção da cepa. A cepa *Fleischmann*, trata-se de uma levedura produzida para panificação e sua aplicação está em função da sua capacidade de produzir gás carbônico, sendo que a condição de estresse provocada pelo excesso de produto (álcool) não se aplica, e como consequência ela apresenta menor rendimento e aproveitamento.

Todos os parâmetros físico-químicos avaliados com as três diferentes cepas de leveduras apresentaram diferença significativa (p<0,05) entre os hidroméis, exceto a acidez total, que para a bebida produzida com as leveduras *Lalvin EC 1118* e *Fleischmann* não diferiram significativamente entre si (p>0,05), ao passo que ambas diferiram estatisticamente (p<0,05) para a bebida produzida com a levedura *Red Star champagne*.

A acidez é um parâmetro importante para avaliar a qualidade das bebidas fermentadas. A acidez relativamente alta indica a formação de ácido acético em demasia, isso ocorre quando o processo fermentativo não é conduzido de modo adequado, contaminação por bactérias acidogênicas ou eventual oxidação provocada pela adição/infiltração de ar atmosférico e conseqüentemente o oxigênio (BAUER e PRETORIUS, 2000; HOHMANN e MAGER, 2003; SROKA e TUSZYNSKI, 2007).

Para os índices de acidez total e acidez volátil a Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008 (BRASIL, 2008), determina limites máximos de 130 e 20 meq.L⁻¹, respectivamente, o que indica que os resultados obtidos neste trabalho para acidez total (53,66 a 66,66 meq.L⁻¹) e volátil (9,00 a 14,66 meq.L⁻¹) demonstram condução adequada dos processos fermentativos para todas as amostras.

Quanto ao teor alcoólico, todas as amostras diferiram entre si ($p < 0,05$), sendo que o hidromel produzido com a cepa *Red Star champagne* apresentou maior teor alcoólico (17,16%) quando comparado aos hidroméis produzidos com as cepas *Lalvin EC 1118* (15,52%) e *Fleischmann* (14,39%), sendo estes resultados coerentes com o teor de açúcar redutor residual das amostras.

Em termos de aproveitamento (consumo do substrato presente no mosto) a cepa *Red Star champagne*, apresentou maior resultado, com aproveitamento de (93,22%), seguida pela *Lalvin EC 1118* (90,95%) e *Fleischmann* com (82,48%).

O rendimento foi calculado em função da produção de etanol a partir de uma determinada quantidade de glicídios. Neste sentido, as três diferentes leveduras apresentaram rendimento significativamente diferente entre si ($p < 0,05$), sendo que a cepa *Red Star champagne*, demonstra melhor desempenho (47,71%), seguida pela *Lalvin EC 1118* (46,32%) e *Fleischmann* (45,93%).

5.4 Composição Volátil dos hidroméis

As características sensoriais do hidromel estão diretamente ligadas a sua composição de compostos voláteis, tais como: alcoóis, ésteres, aldeídos, ácidos carboxílicos, entre outros. A presença e concentração destes compostos estão relacionadas com a qualidade da matéria prima, condições de fermentação e também a maturação (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

A Figura 9 apresenta os cromatogramas sobrepostos das três diferentes amostras de hidromel produzidas neste trabalho.

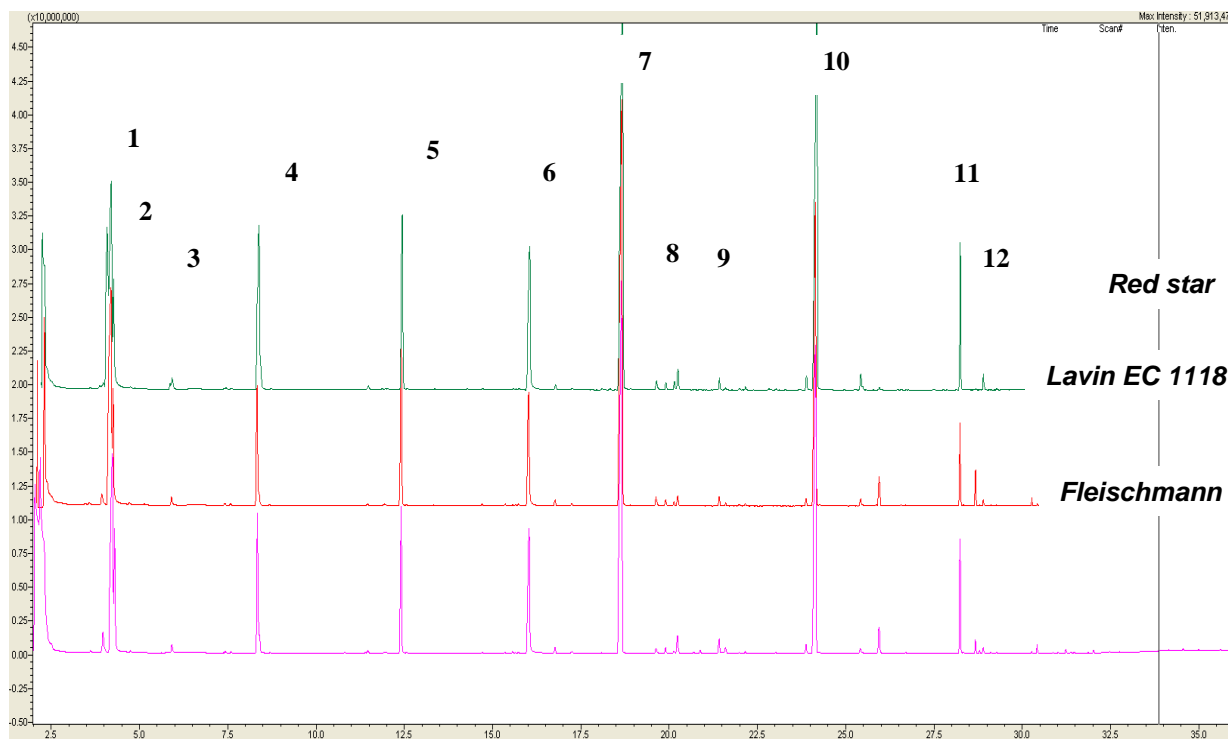


Figura 9. Cromatogramas sobrepostos das três diferentes amostras de hidromel, CG-MS. Onde 1- 3 Metil 1 butanol. 2- 2 Metil 1 butanol. 3- butanoato de etilal. 4- Acetato de isoamila. 5-Hexanoato de etila. 6- Álcool Fenil etílico. 7- Octanoato de etila. 8- Fenil etil acetato. 9- Acetato de fenil etila. 10- Nonanoato de etila. 11- Decanoato de etila. 12- Dodecanoato de etila.

A cromatografia gasosa acoplada a detector de massas é uma poderosa ferramenta para identificação de compostos voláteis, a identificação de substâncias em amostras desconhecidas é realizada pelo detector de massa em função da massa do íon molecular, da massa dos fragmentos, bem como, do padrão de fragmentação da substância (HOLLER, 2009).

O conhecimento da composição em termos de compostos voláteis, principalmente dos ésteres, torna-se uma importante ferramenta, pois a aceitação sensorial, bem como a preferência por parte dos consumidores e/ou julgadores podem estar diretamente relacionadas à composição destes compostos no hidromel, que por sua vez, pode definir qual das bebidas elaboradas mais agrada o paladar dos consumidores.

A Tabela 7 apresenta o tempo de retenção linear, fragmentação e percentual de certeza na identificação dos compostos de interesse no hidromel.

Tabela 7. Fragmentação, tempo de retenção e percentual de certeza da identificação dos compostos voláteis presentes no hidromel.

Compostos	Tempo de retenção min.	Fragmentação (m/z)	Percentual de certeza
3-Metil 1-Butanol	4,27	87 70 55 45 42 31 15	94%
2-Metil 1-Butanol	4,35	87 70 57 45 41 29	96%
Butanoato de etila	6,02	116 101 88 71 60 45 43 29 15	90%
Acetato de isoamila	8,45	115 100 97 87 85 75 70 67 61 55 45 43 38 27 15	97%
Hexanoato de etila	12,40	144 115 99 97 88 83 71 60 55 43 41 29 27 15	95%
Álcool Fenil Etílico	16,04	123 122 105 103 93 91 85 77 74 65 62 51 39 31 26	97%
Octanoato de etila	18,65	172 157 143 131 127 115 109 101 88 83 70 60 57 43 39 29 18	96%
Fenil etil acetato	19,90	164 136 119 105 91 86 77 65 63 51 41 39 29 18	90%
Acetato de fenil etila	20,25	121 105 104 91 77 65 51 43 39 27 15	94%
Nonanoato de etila	21,41	186 157 143 141 129 115 112 101 88 84 73 60 43 41 29 18	93%
Decanoato de etila	24,14	200 171 155 143 129 115 111 101 88 83 73 60 45 43 29 18	96%
Dodecanoato de etila	28,23	228 199 183 171 157 143 129 115 106 101 88 73 61 55 43 29	94%

No entanto, atrasos no processo fermentativo relacionados ao estresse osmótico, falta de nutrientes essenciais ou em função de temperatura inadequada, podem gerar compostos e/ou sabores indesejáveis, dando origem a um hidromel com sabor residual gerado pelas leveduras em função da incapacidade de adaptar-se ao meio (PEREIRA, 2009).

A Tabela 8 apresenta a concentração dos compostos voláteis presentes nas três formulações de hidroméis produzidos com diferentes cepas de leveduras.

Tabela 8. Concentração (mg.L^{-1}) dos compostos voláteis nas amostras de hidromel produzido com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*.

Voláteis	<i>Red Star champagne</i>	<i>Lalvin EC 1118</i>	<i>Fleischmann</i>
	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}
Acetato de etila	66,64 ± 0,39 ^c	71,65 ± 1,07 ^a	43,88 ± 2,00 ^b
Butanoato de etila	0,18 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^b	0,34 ± 0,01 ^a
Acetato de isoamila	0,62 ± 0,014 ^b	0,47 ± 0,01 ^c	0,77 ± 0,01 ^a
Hexanoato de etila	0,28 ± 0,01 ^c	0,31 ± 0,01 ^b	0,36 ± 0,09 ^a
Octanoato de etila	0,37 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^b	0,43 ± 0,01 ^a
Fenil etil acetato	0,45 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,01 ^a
Acetato de finil etila	0,25 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	0,22 ± 0,01 ^b
Nonanoato de etila	0,12 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
Decanoato de etila	0,11 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a
Dodecanoato de etila	0,12 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
3 Metil 1 butanol	358,80 ± 2,87 ^b	365,76 ± 4,94 ^b	512,65 ± 1,69 ^a
2 Metil 1 butanol	49,51 ± 1,92 ^b	40,14 ± 0,55 ^c	61,25 ± 0,75 ^a
Álcool fenil etílico	3,25 ± 0,03 ^b	2,55 ± 0,13 ^c	4,86 ± 0,01 ^a

Os resultados representados referem-se às médias das determinações em triplicatas, seguidos do respectivo desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$). (Análise de variância - ANOVA e Teste de Tukey).

O principal éster encontrado em bebidas alcoólicas é o acetato de etila, o qual é formado durante o processo de fermentação onde uma pequena parte do etanol reage com ácido acético (BARCELOS, 2006). No presente estudo, a concentração do acetato de etila diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras de hidroméis, cujos valores variaram de 43,88 a 71,65 mg.L^{-1} .

Embora, o acetato de etila seja, dentre os voláteis, o mais comumente encontrado em bebidas fermentadas, não tem estabelecido no Regulamento Técnico de identidade e qualidade para hidromel (BRASIL, 2008), o limite de sua concentração para esta bebida. No entanto, a Instrução Normativa n° 13 do MAPA (BRASIL, 2005) estabelece que bebidas fermento-destiladas não possuam mais que 2000 mg.L^{-1} de álcool anidro de ésteres totais expressos em acetato de etila.

Desta forma, e em se tratando de uma bebida fermentada, pode-se inferir que a concentração deste éster na bebida elaborada contribuiu para seu sabor e aroma,

pois, de acordo com Windholz, (1976) e Maia, (1994), baixa concentração de acetato de etila em bebidas alcoólicas pode incorporar um aroma agradável de frutas, porém, em altas concentrações, propicia um sabor indesejável e enjoativo.

Para os demais ésteres, as concentrações encontradas foram bem menores quando comparadas as concentrações do acetato de etila, sendo que de alguns apresentaram, maiores concentrações no hidromel produzido a partir da cepa *Fleischmann*, sendo, butanoato de etila ($0,34 \text{ mg.L}^{-1}$), acetato de isoamila ($0,78 \text{ mg.L}^{-1}$), hexanoato de etila ($0,36 \text{ mg.L}^{-1}$) e octanoato de etila ($0,43 \text{ mg.L}^{-1}$) diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras.

Quanto ao fenil etil acetato a amostra que revelou menor valor ($0,45 \text{ mg.L}^{-1}$) foi a produzida pela cepa *Red Star Campagne*, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras que não diferiram entre si. Já para o acetato de fenil etila a amostra que apresentou maior valor ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) foi o hidromel produzido a partir da cepa *Red Star Champagne*, diferindo estatisticamente das demais amostras ($p < 0,05$), para este composto as demais amostras não apresentaram diferença significativa.

Os ésteres nonanoato de etila, decanoato de etila e dodecanoato de etila foram os compostos que de modo geral apresentaram os menores concentrações em todas as amostras, na maioria dos casos sem diferença significativa ($p > 0,05$), embora em pequenas quantidades estes compostos são considerados importantes para a identidade do aroma do hidromel (PEREIRA, 2015).

Quanto aos álcoois superiores 3-Metil 1-butanol, 2-Metil 1-butanol e Álcool fenil etílico, a amostra que apresentou maiores valores foi a produzida a partir da cepa *Fleischmann* ($512,653 \text{ mg.L}^{-1}$ para 3-Metil 1-butanol, $61,250 \text{ mg.L}^{-1}$ para 2-Metil 1-butanol e $4,86 \text{ mg.L}^{-1}$ para Álcool fenil etílico), sendo observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre todas as amostras. A legislação Brasileira (BRASIL, 2008) não preconiza limites para níveis de álcoois superiores em hidromel. O Ministério de Agricultura (Instrução Normativa n° 13/2005) determina que bebidas fermento-destilladas (cachaça) não possuam mais que $3,6 \text{ g.L}^{-1}$ de álcool anidro de álcoois superiores.

Ao analisar diferentes amostras de hidromel, Mendez-Ferreira (2010), encontrou valores para álcoois superiores (3-metil 1-butanol, 2-Metil 1 butanol e álcool fenil etílico) que variaram entre 250 e 540 mg.L^{-1} .

Para a maioria dos compostos voláteis avaliados, a amostra de hidromel produzido a partir da cepa *Fleischmann*, apresentou maiores concentrações, principalmente para os ésteres que atribuem a bebida aroma frutado e floral, o que pode ter contribuído de forma favorável ao desempenho da bebida durante a análise sensorial.

Os resultados encontrados no presente estudo para compostos voláteis apresentam certa similaridade com os resultados encontrados por Mendes-Ferreira et al. (2010), que avaliou a variação da composição de voláteis em função do preparo do mosto.

Pereira et al. (2015) avaliou a composição de hidromel produzido com diferentes níveis de suplementação com nitrogênio, em ambos os trabalhos a concentração de compostos voláteis variou em função dos diferentes tratamentos. De modo geral, pode-se sugerir que a composição de compostos voláteis em hidromel pode ser afetada pela estirpe de levedura aplicada, pelo modo de preparo do mosto, bem como pela suplementação por nitrogênio.

5.5 Avaliação Sensorial do hidromel

A avaliação sensorial de produtos alimentares é muito importante, pois, ela fornece indicações fundamentais para a produção e comercialização desses produtos, no que diz respeito às preferências do consumidor (DUTCOSKY, 2007).

A Tabela 9 apresenta a média das notas dos atributos cor, aroma e sabor, bem como, da intenção de compra, obtidos em análise sensorial realizada com 112 provadores não treinados.

Tabela 9. Notas dos tributos cor, aroma e sabor, bem como da intenção de compra, para os hidroméis elaborados com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*.

Atributos	<i>Red Star champagne</i>	<i>Lalvin EC 1118</i>	<i>Fleischmann</i>
Cor	7,21 ± 1,57 ^a	7,39 ± 1,43 ^a	7,42 ± 1,43 ^a
Aroma	7,21 ± 1,54 ^a	7,22 ± 1,66 ^a	7,33 ± 1,52 ^a
Sabor	6,26 ± 2,03 ^a	6,99 ± 1,74 ^a	7,58 ± 1,60 ^b
Intenção de compra	3,14 ± 1,19 ^a	3,62 ± 1,08 ^b	4,14 ± 0,93 ^c

Os resultados referem-se às médias das notas atribuídas pelos julgadores para cada amostra, seguidas do respectivo desvio padrão. Para os atributos cor, aroma e sabor a escala hedônica variou de 1 a 9, para a intenção de compra de 1 a 5. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Dos atributos avaliados, a cor e o aroma não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as diferentes leveduras. Quanto ao sabor o hidromel produzido com a levedura *Fleischmann* apresentou maior pontuação diferindo estatisticamente da *Red Star champagne* e da *Lalvin EC 1118*, sendo que também obteve maior pontuação para a intenção de compra, que apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre as três amostras de hidromel.

As notas para intenção de compra demonstram que o hidromel possui grande potencial de mercado. Atualmente a garrafa de hidromel é vendida entre R\$ 40,00 e R\$ 100,00, considerando que o custo de produção é de aproximadamente R\$ 9,00 a garrafa, não contabilizando o investimento inicial e mão de obra, os lucros podem ser maiores que 90% em casos específicos.

Além do tratamento das pontuações relacionadas a avaliação sensorial, utilizou-se, para melhor compreensão dos resultados, a análise estatística “Multivariada” com emprego da análise de componentes principais.

A análise de componentes principais apresenta, por agrupamento, as pontuações atribuídas pelos julgadores formando grupos distintos de preferências, bem como, indica qual dos atributos avaliados contribuiu com maior peso na decisão de preferência. A Figura 10 apresenta a representação gráfica do resultado da análise de componentes principais.

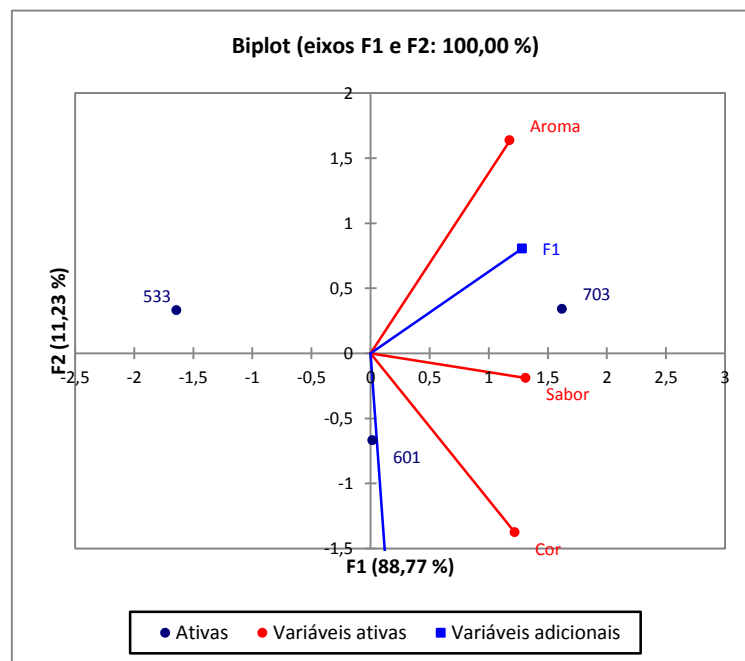


Figura 10. Análise de componentes principais. Onde F1 e F2 representam as preferências 1 e 2, F1 explica 88,77% dos eventos e F2 os 11,23% restantes.

Os dados da análise sensorial geraram dois grandes grupos de preferência, representados por (F1) e (F2). Em resposta a estes grupos, a preferência 1 (F1) responde por 88,77% dos resultados da análise, enquanto que a preferência 2 (F2) responde por 11,23% dos resultados obtidos nesta análise.

Na ACP (análise de componentes principais), avalia-se a concordância pela disposição dos indivíduos (juízes) no gráfico Y2 versus Y1, em que: Y1 e Y2 são, respectivamente, a primeira e a segunda componente principal. A ACP também serve para discriminar diferentes amostras na análise sensorial (SILVA e AZEVEDO, 2009; SILVA e AZEVEDO, 2006).

O software tem como objetivo reunir em grupos distintos o maior número possível de juízes que apresentam gostos semelhantes, neste caso, foi possível abarcar todos os provadores em apenas dois grupos (F1) e (F2), observa-se que o grupo representado por (F1) que responde por 88,77% dos provadores aponta em direção da amostra 703 (*Fleischmann*) amostra que obteve maior preferência, fica evidenciado também que aroma e sabor foram decisivos para este resultado.

A Figura 10 mostra que a amostra 703 (*Fleischmann*) foi a mais preferida, seguida pela amostra 603 (*Lalvin EC 1118*), e que a amostra 533 (*Red Star champagne*) apresentou certa rejeição por parte dos juízes. Observa-se, também que os atributos aroma e sabor tiveram maior peso (interferência) na decisão de preferência, frente ao atributo cor.

5.6 Caracterização físico-química e análise de cor do hidromel maturado em tonéis de Carvalho e Bálamo

Durante o processo de maturação em tonéis de carvalho e bálamo as características físico-químicas de densidade, grau alcoólico, acidez, açúcares e extrato seco, foram avaliados. A caracterização foi realizada no hidromel fresco produzido a partir da cepa *Fleischmann*, e nos períodos de 30, 60, 90, 120 e 180 dias de maturação. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

As amostras de hidromel submetidas ao processo de maturação em madeiras de carvalho e bálamo apresentaram para o parâmetro densidade uma tendência crescente, enquanto o grau alcoólico mostrou tendência decrescente, isso pode ter ocorrido, segundo Gonzáles-Centeno et al. (2016), em função da evaporação do etanol e também em função da extração de compostos da madeira pela bebida.

Para a amostra maturada no carvalho ocorreu mudança significativa já a partir dos trinta dias de maturação, acentuando-se partir dos 120 dias.

Tabela 10. Caracterização físico-química do hidromel maturado em tonéis de carvalho e bálsamo ao longo dos 180 dias de maturação.

Madeira de maturação	Parâmetros	Fresco	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	180 dias
C A R V A L H O	Densidade	1,0056±0,0001 ^{ba}	1,0072±0,001 ^{ab}	1,0071±0,002 ^{aa}	1,0071±0,001 ^{aa}	1,0092±0,002 ^{cb}	1,0110±0,001 ^{db}
	Grau Alcoólico	14,52±0,02 ^{da}	13,86±0,05 ^{aa}	13,87±0,02 ^{aa}	13,77±0,03 ^{aa}	13,36±0,10 ^{ca}	12,79±0,20 ^{ba}
	Acidez Total	65,72±0,46 ^{aa}	65,74±0,29 ^{aa}	65,16±0,18 ^{aa}	65,58±0,38 ^{aa}	65,88±0,40 ^{aa}	65,22±0,09 ^{aa}
	Açúcar Redutor	43,28±0,08 ^{da}	43,25±0,05 ^{cd}	43,06±0,11 ^{bc}	42,92±0,04 ^{ab}	42,78±0,02 ^{aa}	42,19±0,02 ^{ea}
	Extrato seco	86,17±0,32 ^{ba}	89,52±0,36 ^{cb}	91,04±0,07 ^{ab}	91,61±0,38 ^{aa}	104,88±0,39 ^{db}	126,06±0,19 ^{eb}
B Á L S A M O	Densidade	1,0056±0,001 ^{ba}	1,0064±0,001 ^{ba}	1,0074±0,001 ^{aa}	1,0074±0,001 ^{aa}	1,0072±0,001 ^{aa}	1,0087±0,002 ^{ca}
	Grau Alcoólico	14,52±0,02 ^{ea}	14,17±0,06 ^{bb}	13,95±0,02 ^{ab}	13,84±0,03 ^{aa}	13,62±0,02 ^{db}	13,37±0,13 ^{cb}
	Acidez Total	65,72±0,46 ^{aa}	65,16±0,17 ^{aa}	65,32±0,16 ^{aa}	65,73±0,32 ^{aa}	65,95±0,02 ^{aa}	65,62±0,19 ^{aa}
	Açúcar Redutor	43,28±0,08 ^{aa}	43,30±0,04 ^{aa}	43,28±0,11 ^{aa}	43,20±0,02 ^{ab}	43,08±0,03 ^{ab}	42,76±0,15 ^{bb}
	Extrato seco	86,17±0,32 ^{ba}	87,97±0,38 ^{ca}	90,23±0,08 ^{da}	92,67±0,43 ^{ab}	93,26±0,12 ^{aa}	95,76±0,31 ^{ea}

Sendo densidade ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), grau alcoólico (% v/v), acidez total ($\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$), açúcar redutor (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e extrato seco ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados representados referem-se às médias das determinações em triplicatas, seguidos do respectivo desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p>0,05$). Valores da mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, considerando cada parâmetro de forma individual (Análise de variância - ANOVA e Teste de Tukey).

Para a amostra maturada no bálsamo, a densidade só teve alteração com diferença comprovada estatisticamente ($p<0,05$) a partir dos 60 dias de maturação, com maior intensidade a partir dos 120 dias, sendo assim, é possível afirmar que o tempo de maturação deve estar em função das características da madeira do maturador, bem como, das características desejadas para o produto final.

O grau alcoólico apresentou uma tendência decrescente tanto para o hidromel maturado no carvalho quanto para o hidromel maturado no bálsamo. Para ambas amostras, observa-se diferença estatística ($p<0,05$) a partir de 30 dias de maturação, sendo que ao final da maturação (180 dias), a amostra maturada no carvalho apresentou grau alcoólico de 12,72% e a amostra maturada no bálsamo 13,37%, o decréscimo de grau alcoólico ao longo do tempo de maturação deve servir de

referência para se determinar o tempo ideal de maturação, levando-se em conta as características desejadas para o produto final.

Para o parâmetro acidez não ocorreu diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tempos de maturação nem entre as amostras maturadas em diferentes madeiras. Estudos realizados por Téo et al. (2005) demonstraram que para maturação de cachaça o carvalho e o bálsamo não tendem a aumentar o nível de acidez da bebida, enquanto que a madeira amburana aumenta drasticamente a acidez da bebida durante a maturação.

Os níveis de açúcares redutores apresentaram uma tendência decrescente com diferença significativa a partir dos 60 dias de maturação, para o hidromel maturado no carvalho, enquanto que a maturação do hidromel em tonel de bálsamo não mostrou alterações para este parâmetro.

O extrato seco, ambas as amostras de hidroméis apresentaram tendência crescente ao longo do processo de maturação com diferença estatística ($p < 0,05$) a partir de 30 dias de maturação para os dois tratamentos. Ao final do processo de maturação (180 dias) o conteúdo de extrato seco encontrado foi de $126,06 \text{ g.L}^{-1}$ (tonel de carvalho) e $95,76 \text{ g.L}^{-1}$ (tonel de bálsamo). O aumento do extrato seco está diretamente relacionado à perda de etanol e extração dos compostos da madeira, desta forma estas variáveis devem ser controladas durante o tempo de maturação para que a bebida não tenha o teor alcoólico reduzido em demasia, bem como, o extrato seco muito alto tornando o hidromel licoroso.

De modo geral o carvalho apresentou capacidade de alterar as características físico-químicas da bebida de maneira mais rápida e intensa.

A maturação de bebidas alcoólicas em tonéis de madeira tem sido amplamente utilizada para melhorar as características físico-químicas e sensoriais da bebida, sendo comum a perda de álcool por evaporação que varia em função da porosidade da madeira, bem como a mudança de sabor em função da composição química da madeira empregada neste processo. A extração de compostos presentes na madeira deixa a bebida mais encorpada com maior teor de extrato seco e mais densa conseqüentemente (MARTÍNEZ-GIL et al., 2012, GONZÁLES-CENTENO et al., 2016).

A fim de verificar a alteração da cor na bebida elaborada e maturada em tonel de carvalho e bálsamo, realizou-se análise instrumental da cor no hidromel ao longo do tempo de maturação e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação da cor no hidromel fresco e maturado ao longo dos 180 dias de maturação.

		Fresco	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	180 dias
C A R V A L H O	L*	68,40±0,35 ^{CA}	64,59±0,18 ^{AA}	64,40±0,04 ^{AB}	63,82±0,041 ^{abB}	63,93±0,06 ^{abB}	63,52±0,06 ^{bB}
	a*	-1,97±0,02 ^{AA}	-1,89±0,01 ^{AB}	-1,73±0,02 ^{CB}	-1,54±0,02 ^{bB}	-1,46±0,03 ^{bB}	-1,38±0,03 ^{dB}
	b*	16,05±0,13 ^{bA}	17,77±0,05 ^{AB}	17,92±0,18 ^{AA}	19,28±0,19 ^{CA}	21,55±0,08 ^{dB}	27,99±0,02 ^{EB}
	C*	16,12±0,21 ^{bA}	17,86±0,05 ^{AB}	18,00±0,17 ^{AA}	19,34±0,19 ^{CA}	21,45±0,16 ^{dB}	28,03±0,01 ^{EB}
	h*	97,15±0,28 ^{CA}	96,07±0,03 ^{DA}	95,21±0,35 ^{CA}	94,24±0,29 ^{AA}	93,86±0,06 ^{AA}	92,75±0,10 ^{BA}
B Á L S A M O	L*	68,40±0,35 ^{bA}	68,41±0,02 ^{bB}	61,05±0,16 ^{CA}	62,41±0,18 ^{AA}	62,17±0,19 ^{AA}	61,54±0,03 ^{DA}
	a*	-1,97±0,02 ^{AA}	-2,01±0,05 ^{AA}	-1,85±0,04 ^{AA}	-1,84±0,05 ^{AA}	-1,91±0,04 ^{AA}	-1,97±0,22 ^{AA}
	b*	16,05±0,13 ^{AA}	16,42±0,39 ^{AA}	18,20±0,11 ^{BA}	18,96±0,30 ^{BA}	20,66±0,17 ^{CA}	24,45±0,60 ^{DA}
	C*	16,12±0,21 ^{AA}	16,64±0,34 ^{AA}	18,29±0,10 ^{BA}	19,06±0,29 ^{BA}	20,76±0,11 ^{CA}	24,54±0,58 ^{DA}
	h*	97,15±0,28 ^{bA}	96,88±0,47 ^{bA}	95,71±0,28 ^{abA}	95,94±0,35 ^{abB}	95,37±0,05 ^{AB}	94,95±0,84 ^{AB}

Sendo **L*** luminosidade preto/branco, **a*** cor vermelha para valores positivos e cor verde para valores negativos, **b*** cor amarela para valores positivos e cor azul para valores negativos, **C*** saturação de cor e **h*** tonalidade. Os resultados representados referem-se às médias das determinações em triplicatas, seguidos do respectivo desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p>0,05$). Valores da mesma coluna seguidos de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, considerando cada parâmetro de forma individual (Análise de variância - ANOVA e Teste de Tukey).

Para ambas as amostras a luminosidade **L***, apresentou uma tendência decrescente, ou seja, o hidromel ficou mais escuro ao longo do tempo de maturação. Para o hidromel maturado no carvalho a diferença foi significativa a partir dos primeiros 30 dias de maturação, enquanto que o hidromel maturado no bálsamo a diferença para os valores de **L*** foi significativa a partir dos 60 dias de maturação.

Quanto ao parâmetro **a*** (vermelho/verde), a coloração verde foi atenuada pela maturação com carvalho, a mudança significativa ocorreu a partir dos 60 dias de maturação, já a maturação do hidromel em tonel de bálsamo não interferiu nesta variável.

A variável **b*** (amarelo/azul) apresentou características interessantes, acentuando a coloração amarela em ambas as amostras, apresentando, diferença significativa a partir dos 30 dias de maturação para o hidromel maturado em tonel de carvalho e 60 dias para o hidromel maturado em tonel de bálsamo. O mesmo comportamento foi observado para o parâmetro **C*** (saturação de cor), onde se percebeu uma tendência crescente em ambas as amostras e para o parâmetro **h***

(tonalidade), sendo que para ambos observou-se diferença foi significativa já a partir dos 30 dias de maturação para o hidromel maturado no carvalho e 60 dias a, para o hidromel maturado no bálsamo.

A madeira carvalho se mostrou mais eficiente na contribuição de coloração da bebida, uma vez que em menor tempo houve uma maior variação da cor do hidromel quando se compara a bebida fresca com a maturada.

A capacidade de alterar as características da bebida está diretamente ligada a composição química da madeira, bem como de algumas características físicas, como a porosidade (MARTÍNEZ-GIL A. et al., 2012, GONZÁLES-CENTENO et al., 2016).

A Figura 11 demonstra através de imagem digital a evolução da cor ao longo do processo de maturação do hidromel.

A medição colorimétrica instrumental apontou para (alguns parâmetros) diferenças significativas de cor já a partir dos primeiros 30 dias de maturação, contudo, visualmente esta diferença foi perceptível apenas após os 90 dias de maturação.

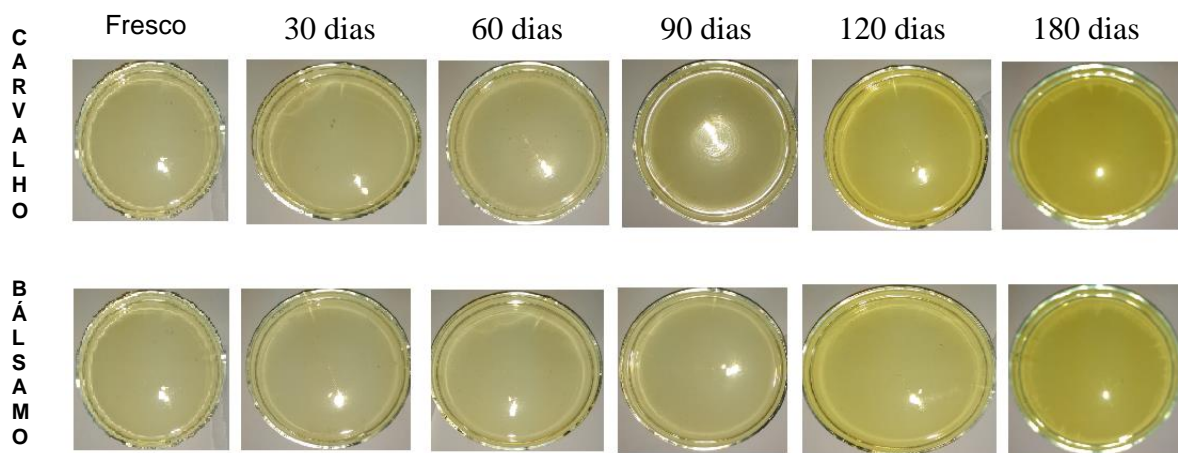


Figura 11. Imagem digital do hidromel fresco comparado com os diferentes tempos de maturação em carvalho e bálsamo.

A capacidade de alterar as características da bebida está diretamente ligada a composição química da madeira, bem como de algumas características físicas, como a porosidade (MARTÍNEZ-GIL A. et al., 2012, GONZÁLES-CENTENO et al., 2016). Kempka e Mantovani, (2013) avaliaram as características físico-químicas (cor) do hidromel produzido a partir de diferentes amostras de mel, os valores

encontrados pelos pesquisadores são similares aos encontrados no presente estudo, no que diz respeito aos parâmetros L^* , a^* e b^* , para hidromel fresco.

6.0 CONCLUSÃO

A matéria prima utilizada na produção de hidromel se apresentou livre de adulterações o que contribuiu para a elaboração de uma bebida fermentada de qualidade.

A cepa *Red Star champagne* demonstrou, para o hidromel, ser a mais eficiente na transformação de açúcar em álcool, no entanto, na análise sensorial esta bebida obteve menor pontuação quando comparado à bebida elaborada com as demais cepas.

A utilização da levedura *Fleischmann* na produção de hidromel caracterizou uma bebida mais doce e com menor teor alcoólico, sendo a de maior preferência na avaliação sensorial.

As três cepas de leveduras parecem ser adequadas para produção de hidromel, no entanto, elas diferem quanto ao teor de açúcar residual e teor alcoólico, produzindo bebidas de diferentes graus alcoólicos.

A bebida produzida a partir da cepa *Fleischmann*, apresentou na maioria dos casos, maior teor de ésteres, o que pode ter contribuído em seu melhor desempenho na análise sensorial frente as outras amostras, uma vez que os ésteres são os principais compostos capazes de atribuir aroma à bebida, principalmente aroma frutado e floral.

Dentre as madeiras testadas na maturação do hidromel (carvalho e bálsamo), o carvalho apresentou capacidade de alterar as características físico-químicas e a cor do hidromel de forma mais rápida e intensa.

O hidromel pode ser uma alternativa aos pequenos produtores de mel para agregar valor ao produto, pois, os resultados demonstram que é possível produzir esta bebida a partir de processo fermentativo simples e acessível.

7.0 REFERÊNCIAS

- ALVES R. M. O.; CARVALHO C. A. L.; SOUZA B. A.; SODRE G. S.; MARCHINI L. C. Physico-chemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaiá* Smith (Hymenoptera: apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.644-650, 2005.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras-SP: Universidade Federal de São Carlos, 33p. 2004.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 18 ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2005.
- BARCELOS, L.V. F. Teores de carbamato de etila e outros congêneres em diferentes aguardentes produzidas em minas gerais. (Dissertação) - Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras – Lavras-MG : 2006. 63p. : il.
- BARBOSA, A. L.; PEREIRA, F. M.; VIEIRA NETO, J. M.; REGO, J. G. S.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R. Criação de abelhas (apicultura). **ABC da Agricultura familiar – EMBRAPA**, Brasília, 122p, 2007
- BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S., Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.21, p.27–51, 2000.
- BERA A.; ALMEIDA-MURADIAN L. B. Physicochemical properties of commercial samples of honey added with propolis from São Paulo state, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,v.27, p. 27- 45., março, 2007.
- BERRY, B. The global mead market: opportunities for canadian mead exporters. Ottawa, Ontário; **Agriculture and Agri-Food Canada**, 2007. Disponível em: <http://ats-sea.agr.gc.ca/canada/4347_e.htm>. Acesso em: 10 de Setembro de 2014.
- BIESMEIJER J. C; SLAA, E. J. The structure of eusocial bee assemblages in Brasil. **Apidologie**. V.37.,p.40-58, 2006.
- BRASIL. MAPA. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do abasteciemnto. **Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008**. Anexo III – Regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para hidromel. Publicado no Diário Oficial da União de 24/04/2008.
- CAC. Codex Stan 12-1981. Codex Alimentarius Commission. **Codex standard for honey**. 2011.

CASELLAS, G.B., Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. Tese de Doutorado. Universitat Rovira i Virgili. cerevisiae IZ 888. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, 2009.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 81 p

CROW, V. L; HOLLAND R.; LIU, S. –Q. Ester and Their Biosynthesis in Fermented Dairy Products: A Review. **International Dairy Journal**, v 14, p. 923-945, 2004.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2007. 239p

EU – Regulamento (EU) nº 1151/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos gêneros alimentícios. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2013:166:0008:0012:PT:PDF>. Acesso: 13/11/2014.

FARIA, J. B. **Determinação dos compostos responsáveis pelo defeito sensorial das aguardentes de cana (Saccharum spp) destiladas na ausência de cobre**. 2000. 99f. Tese (Livre Docência em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

FERNANDES, D.; LOCATELLI, G. O.; SCARTAZZINI, L.S. Avaliação de diferentes estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração. **Evidência, Joaçaba** v. 9, p. 29-42, janeiro/dezembro 2009.

FERREIRA, V; LÓPES, R.;HERNÁNDEZ, P; CACHO, J F. Identification of impact odorants of young red wines made whit Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p. 1461-1467, 1999.

FINOLA M.S, LASAGNO M.C, MARIOLI J.M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**. V.100, nº 4 p.1649-165353, 2007.

GOMES, T. M.C. **Produção de Hidromel: efeito das condições de fermentação. Bragança, Portugal**: ESA. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. 2010.

GONZÁLES-CENTENO, M.R.; CHIRA, K.; TEISSEDRE, P.L., Ellagitannin content, volatile composition and sensory profile of wines from different countries matured in oak barrels subjected to different toasting methods, **Food Chemistry**, v. 210, p.500-511, 2016.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa 7ª ed.**, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 2008

HOHMANN, S.; MAGER, W.H. **Yeast Stress Responses**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2003. 271p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman. p.802-825, 2009.

IAL. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz 2008.

IVORRA, C., PÉREZ-ORTÍN, J.E., DEL OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A Molecular Study. **Journal of Food Technology**, Campinas, v.6, p. 33-42, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>. Acesso em: 17. Agosto. 2015.

JACKMAN, E.A.; BU´LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Alcohol industrial. In Biotecnología básica**. Zaragoza: Acríbia, 1991. 577p.

JIMÉNEZ, A.; GUTIÉRREZ, G. **Métodos para medir propiedades físicas em industrias de alimentos**. Zaragoza: Acríbia, 2001.

KAHOUN, D.; REZKOVA, S.; VESKRNOVA, K.; KRALOVSKY, J.; HOLCAPEK, M.; Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. **Journal of Chromatography**, v.15, p.19-33, 2008.

KEMPKA, P. A.; MANTOVANI, G.K.; Produção de hidromel utilizando méis de diferentes qualidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, p.273-281, 2013.

KUKUROVÁ, K.; KAROVICOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z.; BÍLIKOVÁ, K.; Authentication of honey by multivariate analysis of its physico–chemical parameters. **Journal of Food Nutrition Research**. V.47:170-180, 2008.

LANGFORD, V.; GRAY, J.; FOULKES, B.; PETER, M. J. M., Manuka is the most prized of the NZ honeys both locally and internationally because of health benefits offered by high antibacterial and significant antioxidant activities. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.60, p.06-15, 2012.

LIMA, U. A. **Fabricação em pequenas destilarias**. Piracicaba: Fundação Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, 187 p. 1999.

LI S.; SHAN, Y.; ZHU, X.; ZHANG, X.; LING, G. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.28, p.69-74, 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed Plantarum, 2v. 1992.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A. D.; BIANCHI, R. A. Um sistema para contagem semi-automática de microorganismos. **Pesquisa e Tecnologia**, v 26, p.36-40, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAIA, A.B.R.A. Componentes secundários da aguardente: Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.12, n.6, p.29-33, 1994.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de Alambique**, SEBRAE/MG; SINBEBIDAS, 2005.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 419p. 1989.

MATTIETTO, R. A.; LIMA, F.C. C.; VENTURIERI, G. C.; ARAÚJO, A. A. **Tecnologia para obtenção artesanal de Hidromel do tipo doce**. *Embrapa*. Comunicado Técnico 170, p.1-5, 2006.

MENDES-FERREIRA, A.; COSME, F.; BARBOSA, C.; FALCO, V.; INES, A.; MENDES-FAIA, A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International Journal of Food Microbiology**. 15;144(1):193-8, Nov 2010.

MARTÍNEZ-GIL A.; GARDE-CERDÁN T.; ZALACAIAN A.; PARDO-GARCÍA A. I.; ROSARIO-SALINAS M. Application of na oak extract om Petir Verdote grapevines, Influence on grape and wine volatile compounds. **Food Chemistry**. v.132 p.1836-1845, 2012.

MORÉS S. **Determinação de compostos voláteis em cachaça por microextração em fase sólida** [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.

NAVRATIL, M.; STURDIK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. **Biotechnology Letters**, v.12, p.977-982, Jun 2001.

O'CONNOR-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.

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. Aug 2009.

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

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J.M.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA, A. High.cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food Microbiology**, v.33 p.114-123, setembro 2013.

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J.M.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA, A. Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. **Journal of the institute of Brewing & distilling**, v.12, p 122-128, janeiro de 2015.

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. **Análise sensorial para a avaliação da qualidade dos alimentos**. Rio Grande:Ed. FURG, 2006.268p.

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>>. Acesso em: 12 de maio de 2013.

RODRIGUEZ, B. A.; MENDOZA, S.; ITURRIGA, M. H.; CASTANO-TOSTADO, E. Quality Parameters and Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Mexican Honeys. **Journal of food science**, v.77, p.C121-C127, Jan 2012.

ROLDAN, 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, May 2011.

SEREIA, M. J.; ALVES E. M.; TOLEDO V. A.; MARCHINI L. C.; SERINE E. S.; FAQUINELLO P.; ALMEIDA D. D.; MORETI A. C. Physicochemical characteristics and pollen spectra of organic and non organic honey samples of *Apis mellifera* L. An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, Sept. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137652011000300026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 fev. 2014.

SCHULLER, D.; CASAL, M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. Mini-review. **Applied microbiology and biotechnology**, v.68, p.292-304. 2005.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7.,2009, Orlando. Proceedings...Reno, NV: **Americam Society of Agricultural and Biological Engineers**, p.128-149, 2009.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7.,2009, Orlando. Proceedings...Reno, NV: **Americam Society of Agricultural and Biological Engineers**, p.393-396, 2006.

STATSOFT INC. **Statistica data analysis system version 7.0**. Tulsa: Statsoft Inc., 2004.

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

TÉO, D.; DUARTE, R. M.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Physicochemical characteristics of sugarcane spirits aged in barrels made of different types of wood. **Científica, Jaboticabal**, v.33, n.2, p. 152-159, 2005.

TORRES, A.; GAREDEWA, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey—a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. **Thermochim Acta**, v.415, p.107-113, 2004.

YUCEL, Y.; SULTANOGLU, P. Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v.140, p. 231-237, 2013.

WEAST, R. C. CRC Handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data. Cleveland: CRC, p 1977 – 1978, 2000.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. 2. ed. Guaíba:Ed. Agropecuária, 2005. 378p.

WINDHOLZ, M. The merk index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Rahway: Merk, 1976.

ZUZUARREGUI, A.; DEL OLMO, M. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behaviour. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.699–710, 2004.

9.0 APÊNDICES

- A) Ficha a ser utilizada durante análises sensoriais
- B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- C) Parecer substanciado CEP
- D) Espectros de massas e Cromatogramas
- E) Curvas de calibração (quantificação dos compostos voláteis)

APÊNDICE – A

Nome:		Sexo: () M () F	Idade: _____ anos
Data:	/ /	Horário do teste:	
Avalie cada amostra da esquerda para direita, usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto.			
COR			
Amostra: 533	Amostra: 601	Amostra: 703	
() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	
() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	
() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	
() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	
() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	
() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	
() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	
() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	
() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	
AROMA			
Amostra: 533	Amostra: 601	Amostra: 703	
() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	
() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	
() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	
() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	
() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	
() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	
() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	
() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	
() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	
SABOR			
Amostra: 533	Amostra: 601	Amostra: 703	
() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	() 1. Desgostei muitíssimo	
() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	() 2. Desgostei muito	
() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	() 3. Desgostei regularmente	
() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	() 4. Desgostei ligeiramente	
() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	() 5. Indiferente	
() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	() 6. Gostei ligeiramente	
() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	() 7. Gostei regularmente	
() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	() 8. Gostei muito	
() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	() 9. Gostei muitíssimo	
TESTE PAREADO DE PREFERÊNCIA			
Estamos fazendo uma pesquisa sobre a preferência do consumidor para esta produto. Prove as três amostras da esquerda para direita e indique a ordem da sua preferência.			
Prefiro a amostra: () 533 () 601 () 703			
Dê a razão de sua preferência:			
TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA			
Se você encontrasse esse produto no mercado, indique utilizando a escala abaixo o grau de certeza com que você compraria ou não compraria.			
Amostra: 533	Amostra: 601	Amostra: 703	
() 5. Certamente compraria	() 5. Certamente compraria	() 5. Certamente compraria	
() 4. Possivelmente compraria	() 4. Possivelmente compraria	() 4. Possivelmente compraria	
() 3. Talvez comprasse / Talvez não	() 3. Talvez comprasse / Talvez não	() 3. Talvez comprasse / Talvez não	
() 2. Possivelmente não compraria	() 2. Possivelmente não compraria	() 2. Possivelmente não compraria	
() 1. Certamente não compraria	() 1. Certamente não compraria	() 1. Certamente não compraria	
Muito obrigado!			

APÊNDICE - B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURAS SACCHAROMYCES.

Pesquisador(es), com endereços e telefones:

Mestrando: João Paulo Fernando Mileski (46) 9909 6630

Professora Doutora: Ivane Benedetti Tonial (46) 99129470

Professora Doutora: Silvane Morés (46) 99703810

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR FRANCISCO BELTRÃO

Local de realização da pesquisa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus de Francisco Beltrão, Linha Santa Bárbara s/n, fone (46) 35202600

A) INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

1. Apresentação da pesquisa.

Desenvolver a técnica de obtenção/produção de Hidromel a partir do mel produzido no sudoeste do Paraná.

2. Objetivos da pesquisa.

Determinar qual amostra de Hidromel possui melhor aceitação sensorial do público em geral.

3. Participação na pesquisa.

O participante receberá três amostras de Hidromel, cada amostra com volume não superior a 25mL, será solicitado ao participante para que avalie quesitos como cor, odor e sabor, atribuindo notas em escala hedônica de 1 a 9, onde 1 corresponde a “desgostei muitíssimo” e 9 para “gostei muitíssimo”. O participante deverá também apontar a amostra de sua preferência e falar sobre a sua intenção de compra.

4. Confidencialidade.

Como o resultado da pesquisa não compromete em nada a imagem do participante, o resultado será publicado sem restrições, todavia, a pessoa (identidade) do participante (avaliador) não será citada ou vinculada ao resultado da pesquisa em momento algum.

5. Desconfortos, Riscos e Benefícios.

Pessoas não habituadas ou não adeptas ao consumo de bebidas alcoólicas, bem como pessoas com restrições clínicas ao consumo de álcool, mel ou derivados de mel, deverão se identificar e não participar da pesquisa.

6. Critérios de inclusão e exclusão.

Os participantes serão recrutados de modo aleatório.

7. Direito de sair da pesquisa e a esclarecimentos durante o processo.

Ao participante concede-se o direito de desistir ou abandonar o processo de pesquisa a qualquer momento, sem risco de qualquer penalidade.

8. Ressarcimento ou indenização.

O projeto não prevê nenhum tipo de ressarcimento ou indenização aos participantes.

B) CONSENTIMENTO

Eu declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e ter recebido respostas claras às minhas questões a propósito da minha participação direta (ou indireta) na pesquisa e, adicionalmente, declaro ter compreendido o objetivo, a natureza, os riscos e benefícios deste estudo.

Após reflexão e um tempo razoável, eu decidi, livre e voluntariamente, participar deste estudo. Estou consciente que posso deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

RG: _____
 Data de Nascimento: ___/___/___ Telefone: _____
 Endereço: _____ CEP: _____
 Cidade: _____ Estado: _____

Data: ___/___/___

Assinatura: _____

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível às questões formuladas.

Assinatura pesquisador: _____ Data: _____
 (ou seu representante)

Nome completo: _____

Para todas as questões relativas ao estudo ou para se retirar do mesmo, poderão se comunicar com _____, via e-mail: _____ ou telefone: _____.

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa para recurso ou reclamações do sujeito pesquisado.

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEP/UTFPR) REITORIA: Av. Sete de Setembro, 3165, Rebouças, CEP 80230-901, Curitiba-PR, telefone: (41) 3310-4943, e-mail: coep@utfpr.edu.br

OBS: este documento deve conter duas vias iguais, sendo uma pertencente ao pesquisador e outra ao sujeito de pesquisa.

APÊNDICE – C

HOSPITAL ECOVILLE/
INSTITUTO DE NEUROLOGIA
DE CURITIBA S/C LTDA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da fermentação do mel por ação de diferentes leveduras na produção de hidromel, caracterização Físico-Química, compostos voláteis e sensorial antes e após o processo de maturação da bebida em tonéis de madeira.

Pesquisador: João Paulo Fernando Mileski

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35293414.2.0000.5227

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 968.053

Data da Relatoria: 17/03/2015

Apresentação do Projeto:

O mel é uma mistura complexa, de origem animal, produzida por abelhas melíferas e consiste em uma solução supersaturada de açúcares, com a frutose e a glicose como os principais sacarídeos, carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, flavonoides, minerais, pigmentos e grãos de pólen. Conhecido desde a antiguidade, o mel sempre atraiu a atenção do homem devido à sua doçura, sabor e cor. O mel foi uma das primeiras fontes de açúcar para o homem e ainda é utilizado como um substituto deste (Alves, Carvalho, et al., 2005, Bera and Almeida-Muradian, 2007, Pohl, 2009). Além de ser um edulcorante e um alimento energético, o mel também é conhecido por se rico em antioxidantes naturais, como os flavonoides e outros compostos fenólicos, e por suas potenciais propriedades terapêuticas. A

Endereço: Rua Jeremias Maciel Perreto, 300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.210-310
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3028-9542 **Fax:** (41)3028-8580 **E-mail:** cep@inc-neuro.com.br

HOSPITAL ECOVILLE/
INSTITUTO DE NEUROLOGIA
DE CURITIBA S/C LTDA



Continuação do Parecer: 988.053

apicultura é

uma atividade econômica positiva, que gera empregos, fluxo de renda e que propicia a fixação do homem no meio rural. E um estímulo a mais à apicultura é a produção de Hidromel, bebida elaborada a partir da fermentação do mel de abelhas diluído em água, com possível adição de suco de frutas, extrato de ervas ou outras especiarias e que possui em torno de 9 a 18% em volume de álcool. Produtos fermentados à base de mel, como o Hidromel, são largamente conhecidos e consumidos na Europa. Porém, no Brasil, produtos com esta característica ainda são pouco populares, talvez pela falta de conhecimento e/ou estudos tecnológicos para sua obtenção. O projeto visa promover o conhecimento tecnológico do processo de fermentação

alcoólica do mel, estudando propriedades físico-químicas e compostos voláteis do Hidromel durante sua fermentação, com levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), originalmente destinadas à produção de vinho e de champagne. O período de envelhecimento (maturação) e as condições de armazenagem podem conferir características singulares. A maturação pode ocorrer em recipientes de vidro ou outros maturadores como tonéis de madeira que lhe conferem características sensoriais e físico-químicas particulares como o carvalho (*Quercus alba*) da América do Norte ou o álamo (*Myroxylon balsamun* (L.) Harms), comum no Brasil. Investigar o processo de fermentação alcoólica do mel, com uso de diferentes leveduras comerciais, avaliar

os compostos voláteis, as características sensoriais, físico-química de hidromel não maturado e maturado.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o processo de fermentação alcoólica do mel, com uso de diferentes leveduras comerciais, avaliar

Endereço: Rua Jeremias Maciel Perreto, 300
Bairro: Campo Comprido CEP: 81.210-310
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3028-9542 Fax: (41)3028-8580 E-mail: cep@inc-neuro.com.br

HOSPITAL ECOVILLE/
INSTITUTO DE NEUROLOGIA
DE CURITIBA S/C LTDA



Continuação do Parecer: 968.053

os compostos voláteis, as características sensoriais, físico-química de hidromel não maturado e matutado em diferentes tipos de maturadores. Para isto serão cumpridas algumas etapas: Análise físico-química do mel; Análise físico-química do Hidromel; Quantificação de compostos voláteis do Hidromel; Determinar os compostos voláteis de cada Hidromel maturado em diferentes materiais; Comparar os resultados dos Hidroméis maturados em diferentes recipientes quanto aos resultados das análises sensoriais, físicoquímica e de compostos voláteis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

contemplados adequadamente pelo pesquisador

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

o projeto está bem claro em termos de caracterização do tema e descrição do processo de produção do hidromel, riscos de produção e armazenamento do produto, bem como sobre sua ingestão. Contempla a descrição da fonte do recurso para prover o material e insumos necessários para a realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado, descrevendo os riscos de consumo do produto segundo as normas da resolução 466/2012

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

o projeto se mostra dentro das normas da resolução 466/2012 e atende as exigências deste comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

o projeto de pesquisa se encontra dentro das normas da resolução 466/2012. Está adequado na

Endereço: Rua Jeremias Maciel Perreto, 300
Bairro: Campo Comprido CEP: 81.210-310
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3028-9542 Fax: (41)3028-8580 E-mail: cep@inc-neuro.com.br

HOSPITAL ECOVILLE/
INSTITUTO DE NEUROLOGIA
DE CURITIBA S/C LTDA



Continuação do Parecer: 988.053

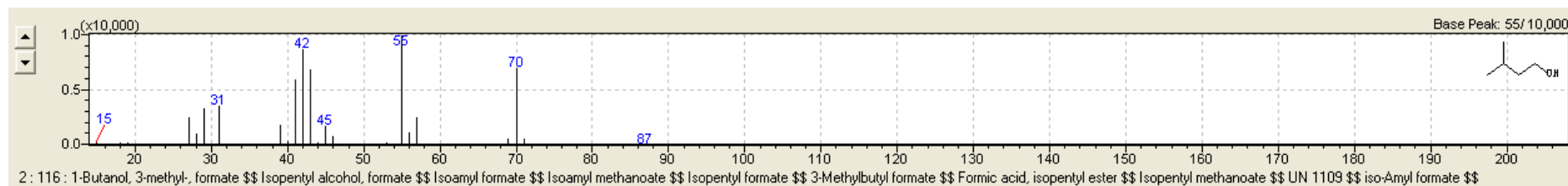
contemplação de riscos e benefícios e o TCLE se mostra adequado, portanto o CEP indica sua aprovação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2015

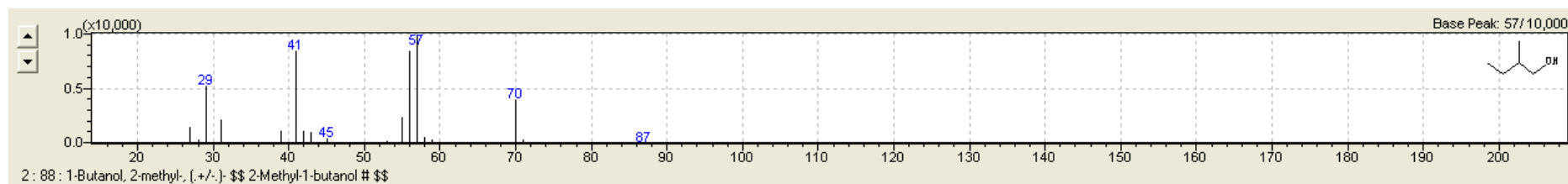
Assinado por:
Samanta Fabricio Blattes da Rocha
(Coordenador)

Endereço: Rua Jeremias Maciel Perreto, 300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.210-310
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3028-9542 **Fax:** (41)3028-8580 **E-mail:** cep@inc-neuro.com.br

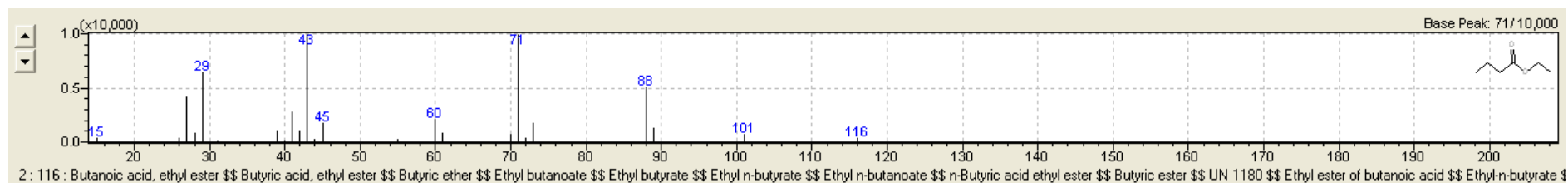
APÊNDICE – D



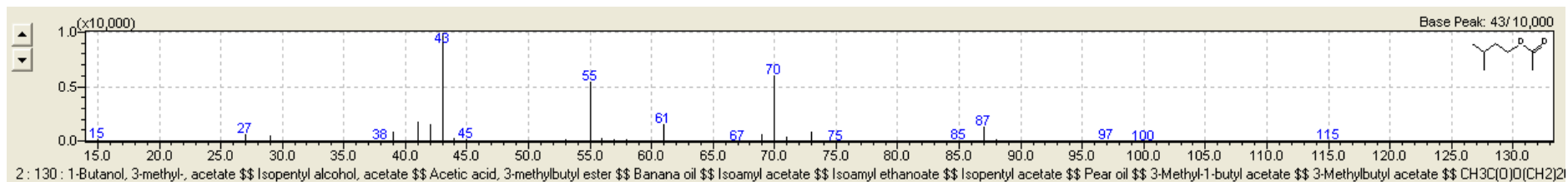
Apêndice D1 – Espectro de massas do 3-Metil 1-butanol.



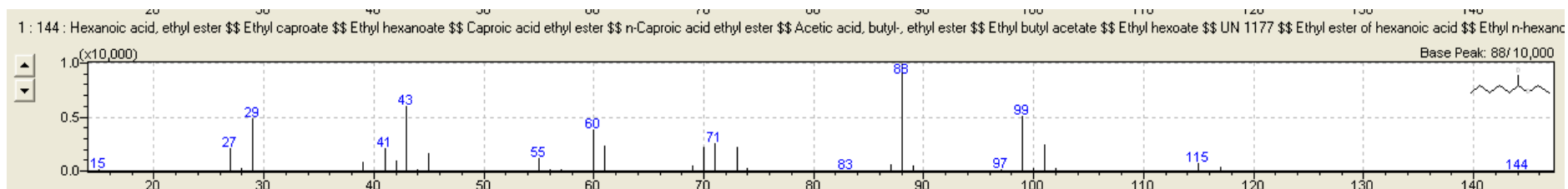
Apêndice D2 – Espectro de massas do 2-Metil 1-butanol.



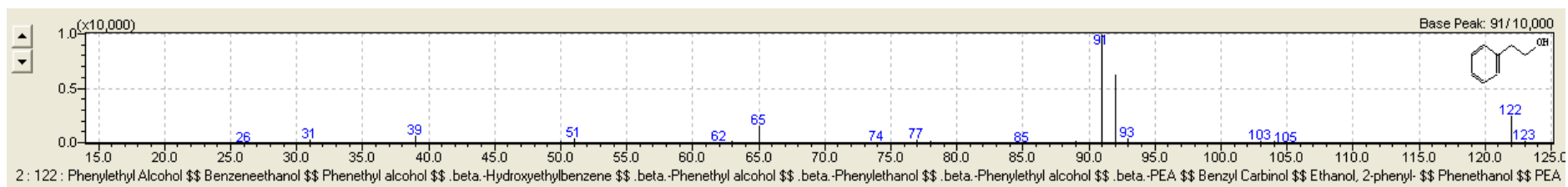
Apêndice D3 – Espectro de massas do Butanoato de etila.



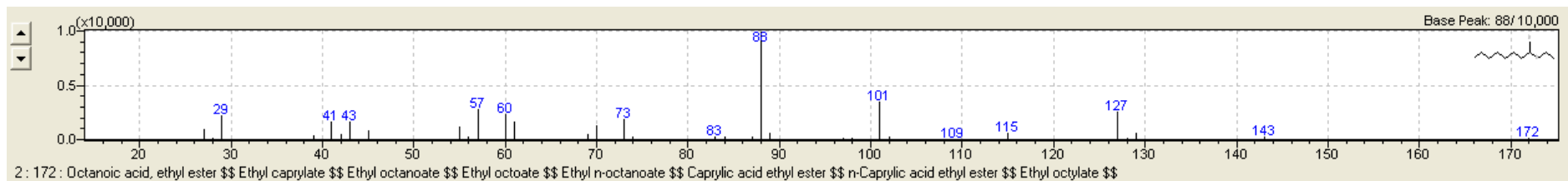
Apêndice D4 – Espectro de massas do Acetato de isoamila.



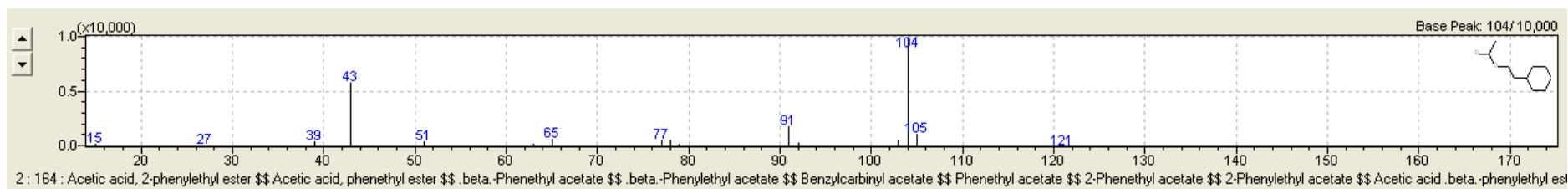
Apêndice D5 – Espectro de massas do Hexanoato de etila.



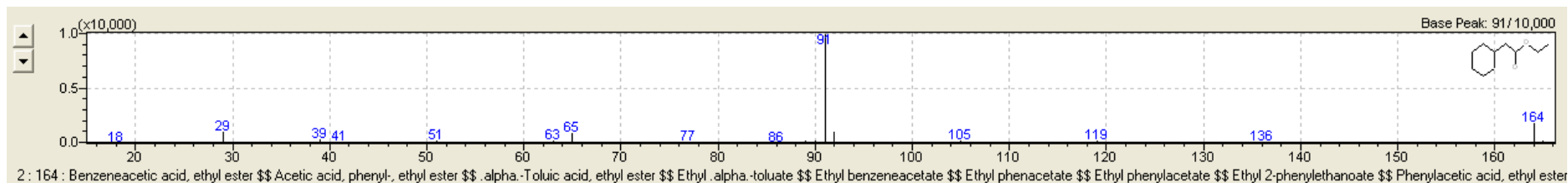
Apêndice D6 – Espectro de massas do Álcool fenil etílico.



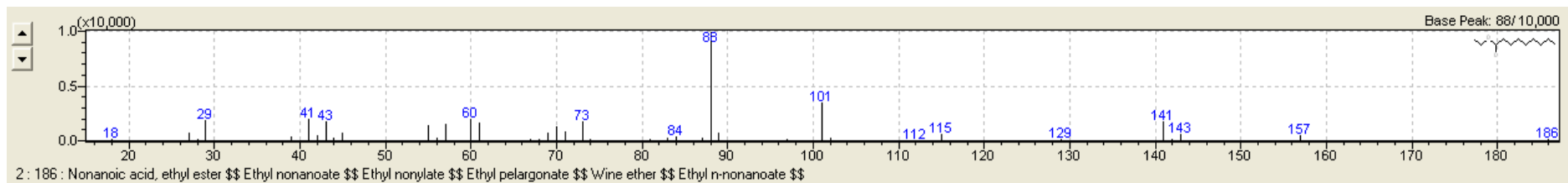
Apêndice D7 – Espectro de massas do Octanoato de etila.



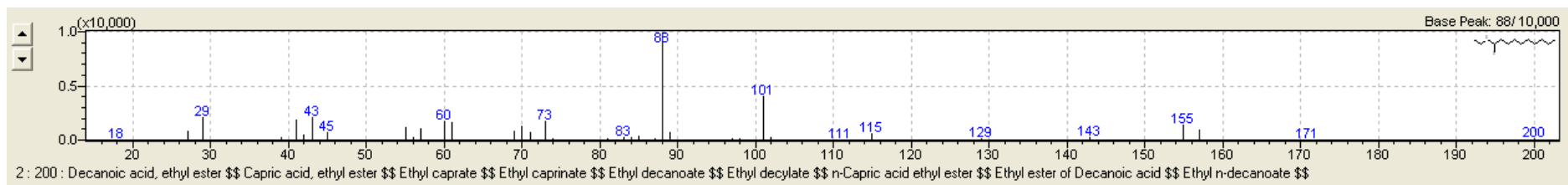
Apêndice D8 – Espectro de massas do Fenil etil acetato.



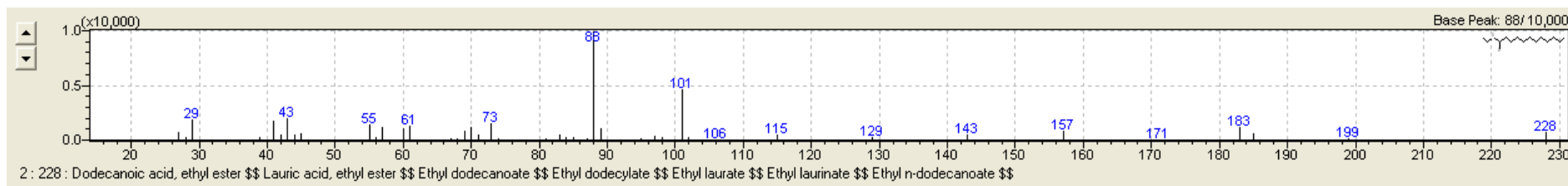
Apêndice D9 – Espectro de massas do Acetato de fenil etila.



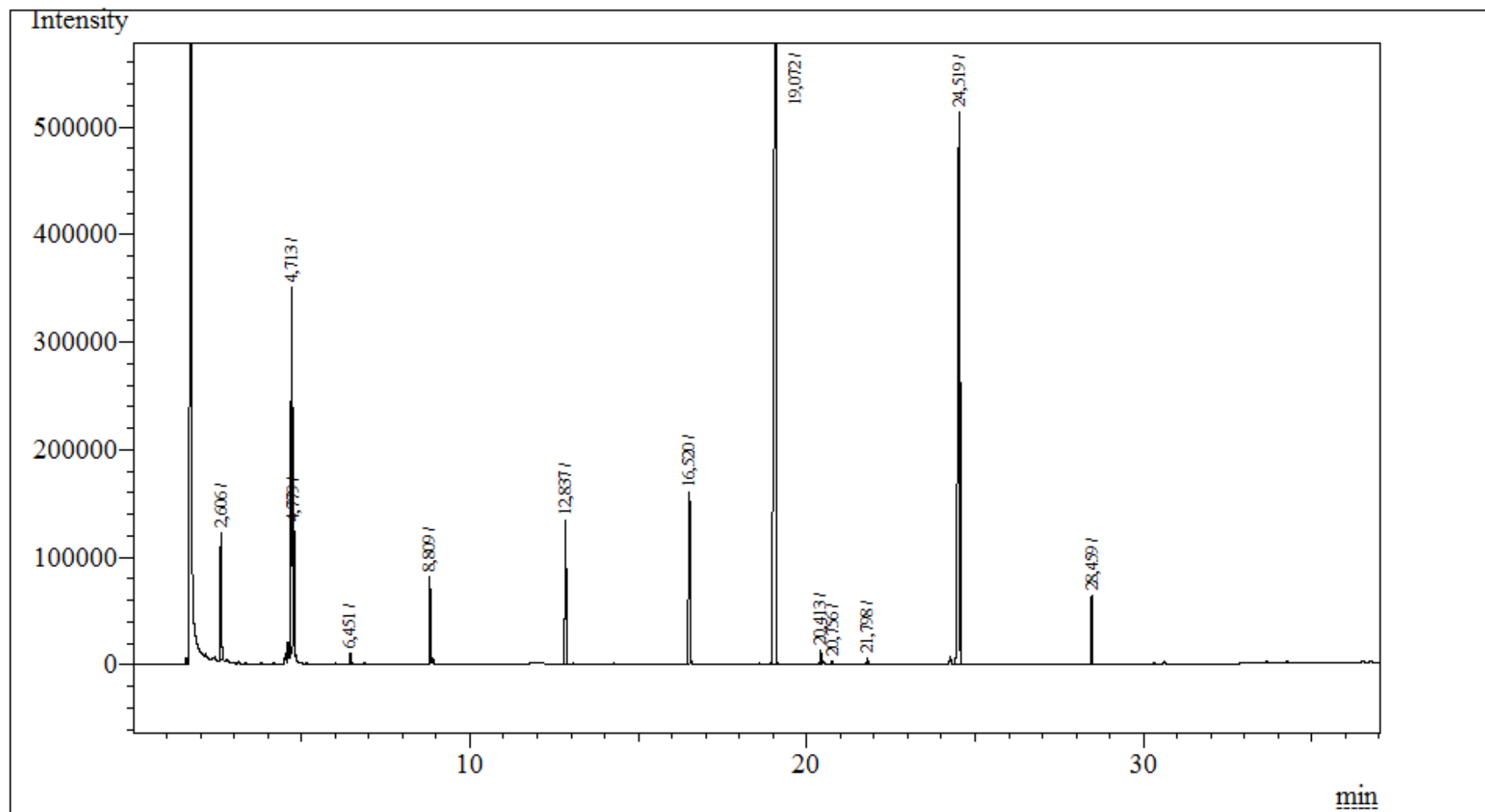
Apêndice D10 – Espectro de massas do Nonanoato de etila.



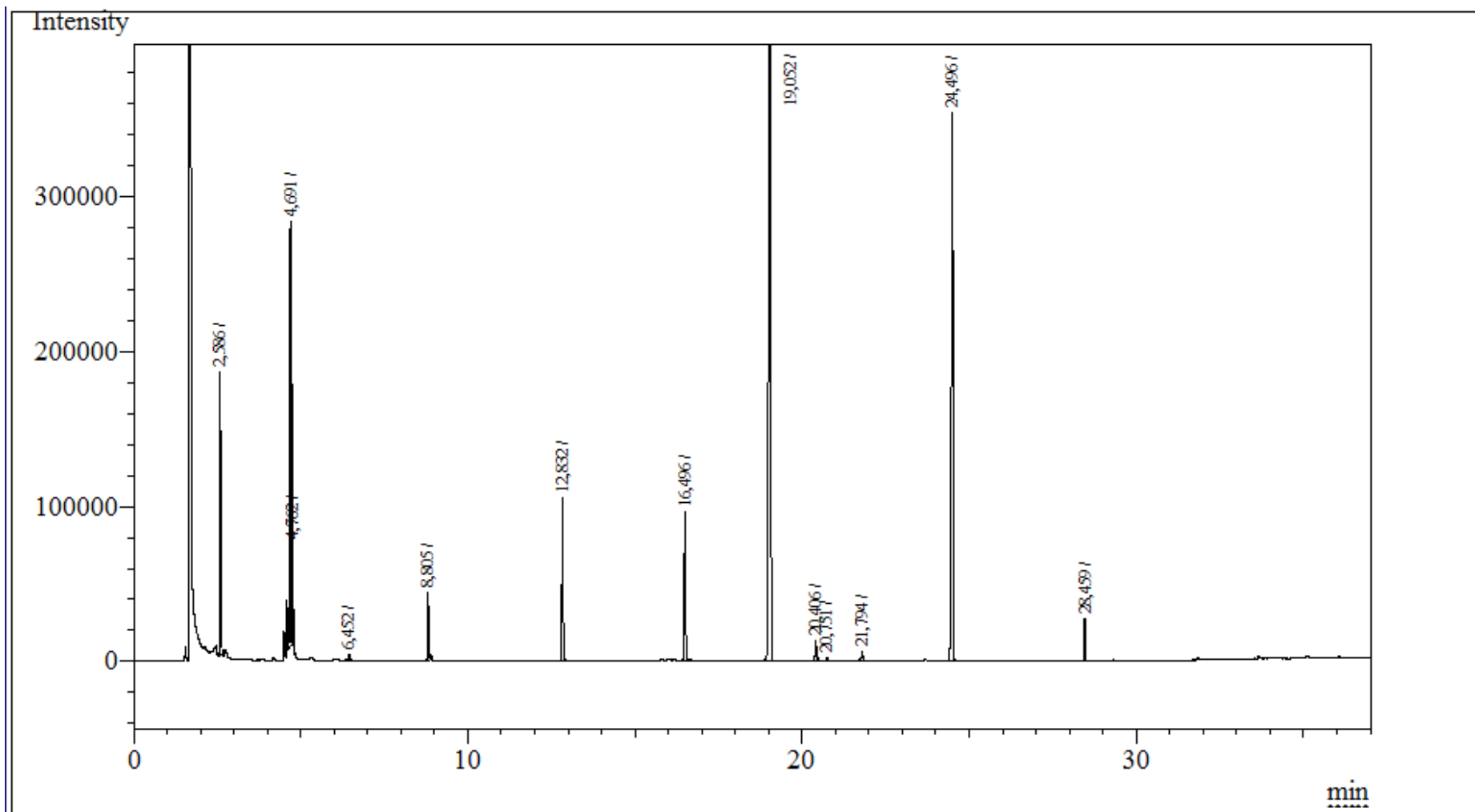
Apêndice D11 – Espectro de massas do Decanoato de etila.



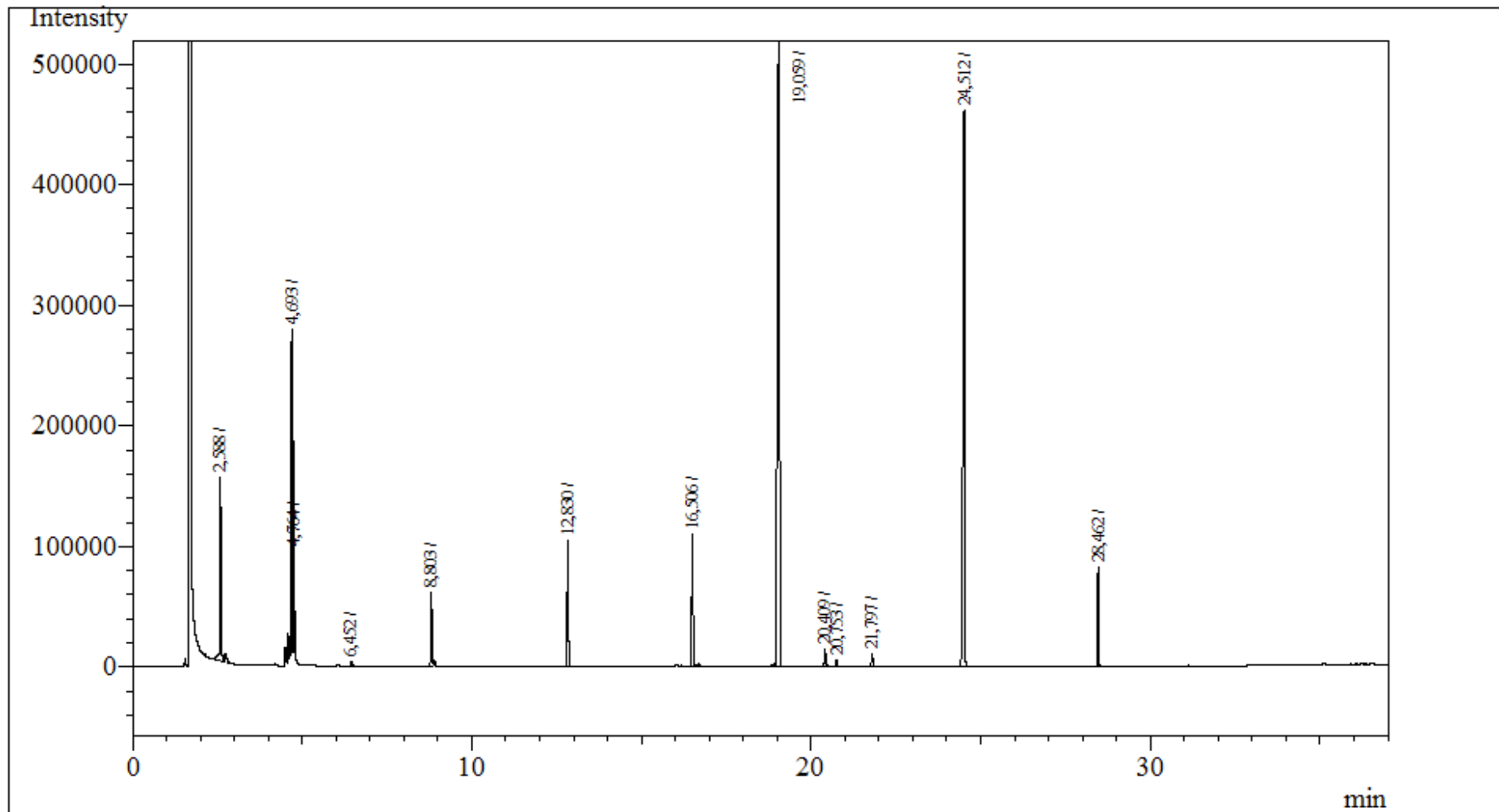
Apêndice D12 – Espectro de massas do Dodecanoato de etila.



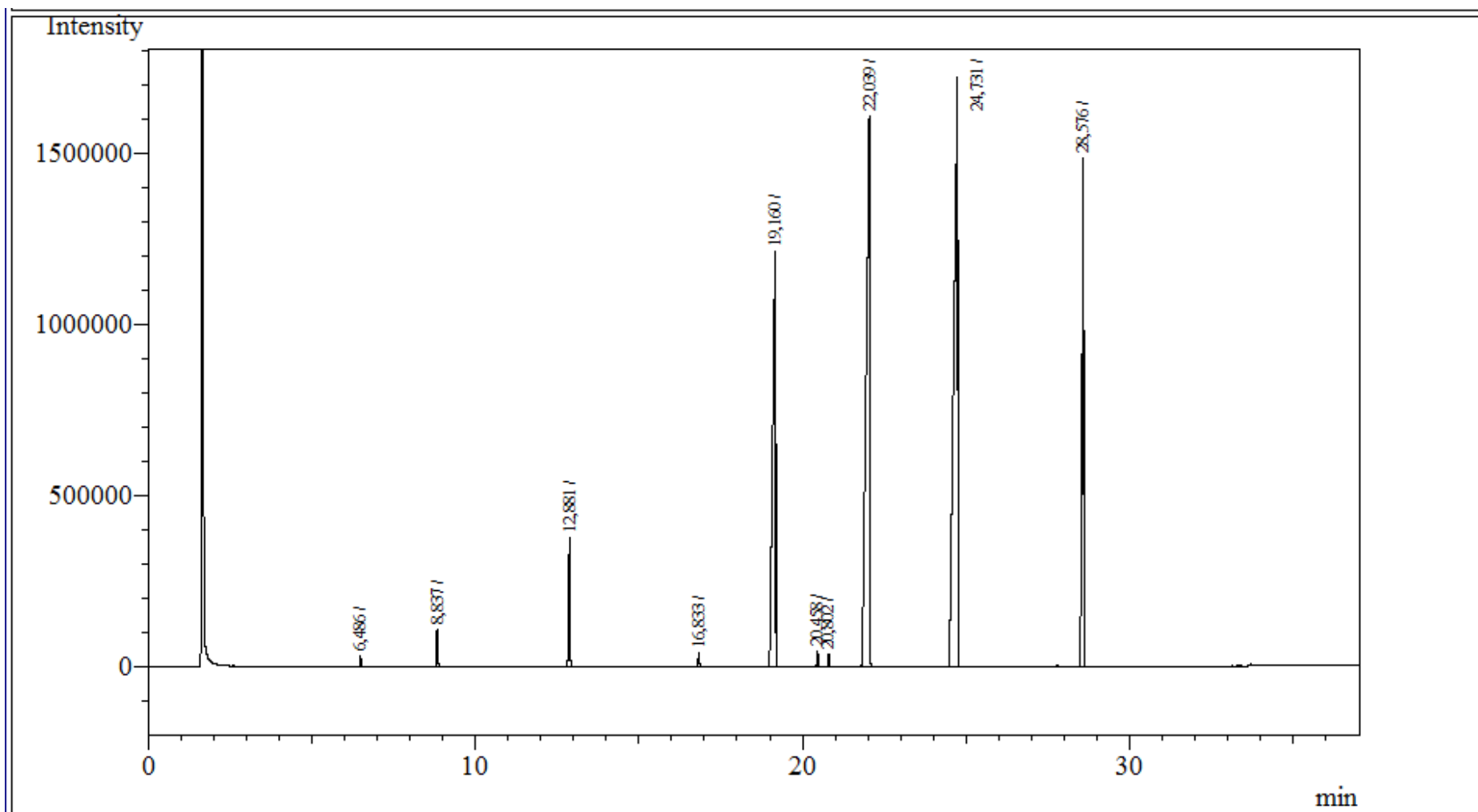
Apêndice D13 – Cromatograma amostra Fleischmann.



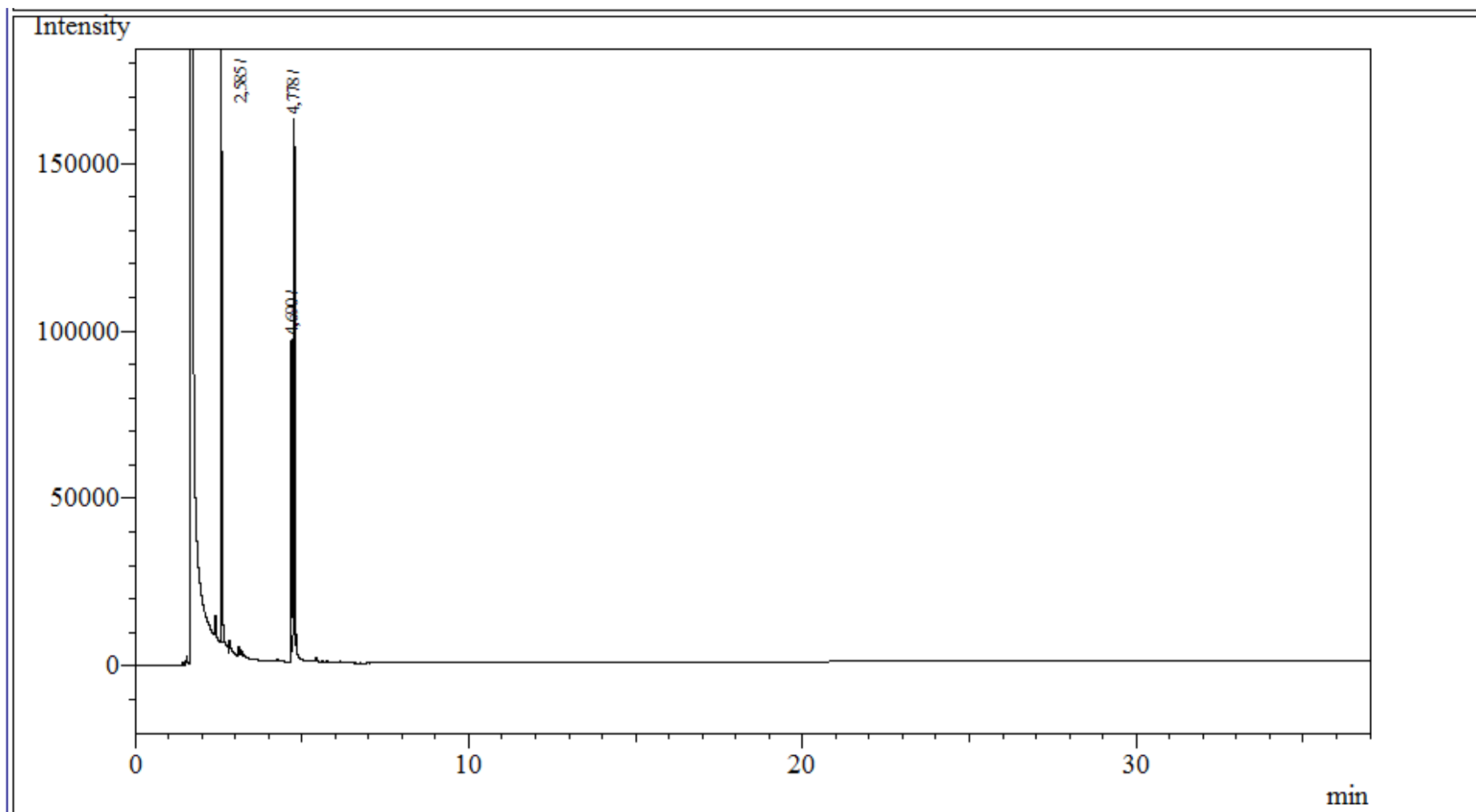
Apêndice D14 – Cromatograma amostra Lalvin EC 1118.



Apêndice D15 – Cromatograma amostra Red Star Champagne.



Apêndice D16 – Cromatograma padrão 1mg/L Butanoato de etila, Acetato de isoamila, Hexanoato de etila, Álcool fenil etílico, Octanoato de etila, Fenil etil acetato, Acetato de fenil etila, Nonanoato de etila, Decanoato de etila, Dodecanoato de etila.



Apêndice D17 – Cromatograma padrão 100 mg/L Acetato de etila, 3-Metil 1-butanol e 2-Metil 1-butanol.

APÊNDICE – E

