

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Isolamento de leveduras, produção e caracterização de
Hidromel**

Vânia Casari Mussato

Ribeirão Preto - SP

2023

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Isolamento de leveduras, produção e caracterização de
Hidromel**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia para a obtenção de título de doutora em Biotecnologia pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

Doutoranda: Me. Vânia Casari Mussato

Orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede

Ribeirão Preto - SP

2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

MUSSATO, Vânia Casari, 1985-
M989i Isolamento de leveduras, produção e caracterização de
hidromel / Vânia Casari Mussato. -- Ribeirão Preto, 2023.
98 f. : il. color.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Juliana da Silva Coppede.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Doutorado em Biotecnologia, 2023.

1. Fermentação. 2. Mel. 3. Leveduras. II. Título.

CDD 660.6

VÂNIA CASARI MUSSATO

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
HIDROMEL**

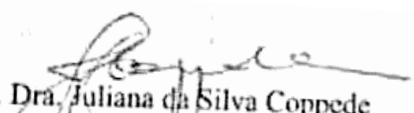
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Agricultura e ao Meio Ambiente

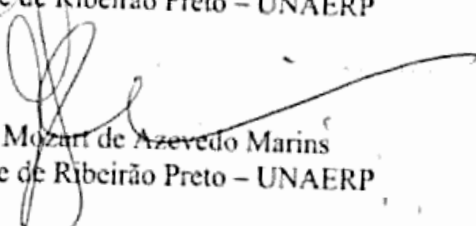
Data da defesa: 28 de março de 2023

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA




Prof. Dra. Juliana da Silva Coppede
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



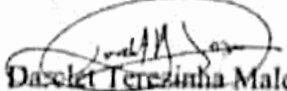
Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Dra. Ellen Francine Rodrigues
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Dra. Daselet Terezinha Malerbo de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Ribeirão Preto - SP

2023

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão por todo o apoio e suporte que recebi durante minha jornada de doutorado. Este momento não teria sido possível sem a colaboração de tantas pessoas incríveis, e sou profundamente grata por cada um de vocês.

Primeiramente, quero agradecer aos meus orientadores, Dra. Juliana e Dr. Mozart, que me guiaram e aconselharam com sabedoria e paciência ao longo de todo o processo. Suas contribuições foram fundamentais para o sucesso deste trabalho, e eu sou muito grata por tê-los como guias nessa jornada.

Agradeço aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa, por compartilharem seu conhecimento e experiência, além das valiosas contribuições para esse trabalho. Agradeço também aos meus colegas de trabalho e colaboradores, que trabalharam lado a lado comigo e me ajudaram a superar os desafios que surgiram ao longo do caminho. Sem a colaboração de vocês, este trabalho não teria sido tão rico e completo como se tornou.

Agradeço a Profa. Dra. Juliana Coppede por suas palavras gentis, disposição e sorrisos que sempre foram uma fonte de inspiração e motivação para mim.

Agradeço aos amigos de longa data que sempre pude contar em todos os momentos, e aos novos amigos que expandiram os horizontes. Agradecimentos especiais a Dr^a Leticia Pacheco que mesmo longe se faz presente em momentos decisivos desde a graduação.

Quero também agradecer à minha família, que proporcionou todo o amor e apoio incondicional. Em especial minha mãe que sempre me apoiou e ao meu pai que disponibilizou a matéria prima desse trabalho. Sem o encorajamento e suporte moral deles nada disso seria possível. Gostaria de agradecer a mim mesma, que não deixei me desanimar frente aos obstáculos.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os amigos e colegas que se propuseram a colaborar com os testes sensoriais, e mesmo os que não puderam comparecer, mas torceram para que tudo ocorresse bem.

Muito obrigada a todos vocês que de alguma forma fizeram parte dessa jornada. Estou profundamente agradecida e honrada por ter convivido com pessoas tão incríveis e dedicadas.

“Nada é permanente, exceto a mudança. O fim de uma era é o começo de uma nova jornada...”

Resumo

O hidromel é uma antiga bebida produzida a partir da fermentação da mistura de mel e água, algumas receitas podem conter especiarias, flores, frutas e grãos. Embora o hidromel não seja tão popular quanto outras bebidas fermentadas, como cerveja e vinho, há uma crescente demanda pelo produto no Brasil. Entretanto, a produção de hidromel enfrenta desafios relacionados à legislação, padronização e popularização do produto. Portanto, pesquisas sobre os processos fermentativos e as leveduras utilizadas na produção do hidromel, são bem-vindas para tornar viável essa alternativa promissora capaz de agregar valor ao mel brasileiro. Este estudo teve como objetivo utilizar leveduras isoladas do mel e de resíduos de hidroméis artesanais para produzir e caracterizar o hidromel de acordo com a legislação vigente. Na primeira etapa do estudo, foram isoladas leveduras presentes em amostras de mel e lama de hidromel. Em seguida, o material genético dessas leveduras foi extraído, purificado e sequenciado. O resultado do sequenciamento revelou a presença de duas espécies de leveduras, sendo seis *Saccharomyces cerevisiae* e uma *Rhodotorula mucilaginosa*. As leveduras foram submetidas a teste piloto de crescimento em meio de cultura e mosto de mel, e se desenvolveram em ambos. A partir da escolha de três leveduras, o processo de fermentação do mosto de mel e água foi realizado sem suplementação nutricional. Após a estabilização a 17 °Brix, o final do processo fermentativo foi evidenciado e, decorridos 30 dias de clarificação a frio, o hidromel foi engarrafado e caracterizado físico-quimicamente de acordo com os padrões de qualidade e identidade para hidromel. Os resultados físico-químicos mostraram que o hidromel obtido está em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação. Os compostos voláteis identificados em amostras de hidromel, não participam da composição majoritária das amostras de mosto e mel, sugerindo que sua formação ocorra durante o processo de fermentação. Foram realizados testes de análise sensorial com consumidores não treinados no produto. Os resultados dos testes de aceitação e ranqueamento não apresentaram diferenças significativas entre as amostras de hidromel, demonstrando não haver preferência por uma amostra específica. Contudo, o resultado do teste de intenção de compra, comprovou que o produto tem potencial de expansão no mercado consumidor.

Palavras-Chave: Análise sensorial. Fermentação. Mel. *Rhodotorula mucilaginosa*. *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Mead is an ancient drink produced from the fermentation of a mixture of honey and water, some recipes may contain spices, flowers, fruits and grains. Although mead is not as popular as other fermented beverages such as beer and wine, there is a growing demand for the product in Brazil. However, mead production faces challenges related to legislation, standardization and popularization of the product. Therefore, research on the fermentation processes and yeasts used in the production of mead are welcome to make this promising alternative capable of adding value to Brazilian honey viable. This study aimed to use yeasts isolated from honey and from artisanal mead residues to produce and characterize mead in accordance with current legislation. In the first stage of the study, yeasts present in samples of honey and mead mud were isolated. Then, the genetic material of these yeasts was extracted, purified and sequenced. The sequencing result revealed the presence of two yeast species, six *Saccharomyces cerevisiae* and one *Rhodotorula mucilaginosa*. The yeasts were submitted to a pilot growth test in culture medium and honey must, and developed in both. From the choice of three yeasts, the fermentation process of the honey and water wort was carried out without nutritional supplementation. After stabilization at 17 °Brix, the end of the fermentation process was evidenced and, after 30 days of cold clarification, the mead was bottled and characterized physicochemically according to the standards of quality and identity for mead. The physical-chemical results showed that the mead obtained complies with the parameters established by legislation. The volatile compounds identified in mead samples do not participate in the majority composition of must and honey samples, suggesting that their formation occurs during the fermentation process. Sensory analysis tests were carried out with consumers not trained in the product. The results of the acceptance and ranking tests did not show significant differences between the mead samples, demonstrating that there is no preference for a specific sample. However, the result of the purchase intention test proved that the product has potential for expansion in the consumer market.

Keywords: Fermentation. Honey. Mead. Sensory analysis tests. Yeasts.

Lista de abreviaturas e siglas

A31	Levedura e hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , neste trabalho também identificada como A31
A51	Levedura e hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa A51 (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) isolada de resíduo de mel
a.C.	Antes de Cristo
ABEMEL	Associação Brasileira de Exportadores de Mel
ABV	Álcool por volume
ABW	Álcool por peso
ANOVA	Análise de variância
ART	Açúcares redutores totais
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
Bx	Brix
CBA	Confederação Brasileira de Apicultura
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
Eq	Equivalente

ES	Extrato seco
ESR	Extrato seco reduzido
<i>et al.</i>	et alii (“e outros”, masculino plural) et aliae (“e outras”, feminino plural)
EUA	Estados Unidos da América
F	Fermentação
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
GenBank	Banco de Dados do NCBI subsidiado pelo <i>National Center for Biotechnology Information</i>
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HMF	Hidroximetilfurfural
IC	Intervalo de confiança
ITS	Região espaçadora, <i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>K.</i>	<i>Kluyveromyces</i>
Kg	Kilograma
L	Litro
M05	Levedura e hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M05, comercializada pela empresa Jack Magroves®
m/v	Massa por volume
<i>m/z</i>	Relação Massa Carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mEq	MiliEquivalente
mEq/Kg	MiliEquivalente por kilo

mEq/L	MiliEquivalente por litro
mg	Miligrama
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , cologaritmo da atividade de íons hidrônio
ppm	Parte por milhão
R.	<i>Rhodotorula</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
SAB	Ágar Sabouraud
sp.	Abreviatura de espécie
spp.	Abreviatura de espécies
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i>
STES	Tampão de Lise
T.	<i>Torulaspora</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , Taq DNA polimerase, Taq polimerase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão de Eluição
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
v/v	Volume por volume

YPD *Yeast Potato Dextrose*

ng/mL Nanograma por mililitro

µg/mL Micrograma por mililitro

Lista de Figuras

Figura 1 - Reações enzimáticas terminais de fermentação de levedura.	35
Figura 2 - Localização da região de rDNA entre os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.	47
Figura 3 - Fluxograma das atividades.	55
Figura 4 - Fragmentos de amplificação da região ITS e padrão do marcador utilizado.	56

Lista de Gráficos

Gráfico 1 Crescimento em meio de cultura Sabouraud.	59
Gráfico 2 Crescimento celular em mosto.	60
Gráfico 3 Variação °Brix durante a fermentação.....	63
Gráfico 4 Porcentagem de participantes distribuídos por fermentação.	75
Gráfico 5 Distribuição dos avaliadores por idade e sexo.	75
Gráfico 6 Proporção de avaliadores quanto ao consumo de hidromel.	76
Gráfico 7 Distribuição das notas da escala hedônica para impressão geral.	77
Gráfico 8 Percepção dos consumidores sobre a amostra 310.	78
Gráfico 9 Percepção dos consumidores sobre amostra 510.	78
Gráfico 10 Percepção dos consumidores sobre amostra 050.	79
Gráfico 11 Distribuição global da intenção de compra do produto hidromel.	81
Gráfico 12 Distribuição de preferência do consumidor.	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Definição das categorias populares de hidromel.	20
Tabela 2 - Padrões de identidade e qualidade para hidromel segundo legislação brasileira (MAPA).	21
Tabela 3 - Parâmetros do mel floral vigentes na legislação brasileira	23
Tabela 4 - Componentes do mel, valores médio, mínimo e máximo, expressos em g / 100 g (%).	26
Tabela 5 - Descritivo morfológico do isolamento de amostras de leveduras	56
Tabela 6 - Caracterização físico-química dos hidroméis produzidos com as diferentes cepas de leveduras.	65
Tabela 7 - Análise química dos voláteis presentes no mel, mosto e hidroméis resultantes dos processos fermentativos estabelecidos no departamento de biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto -UNAERP.	70
Tabela 8 - Análise similaridade Blast.....	92

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica.....	19
2.1. Hidromel	19
2.2. Mel.....	22
2.3. Leveduras.....	28
2.4. Identificação molecular de leveduras.....	32
2.5. Processos fermentativos	34
2.6. Compostos voláteis	38
2.7. Análises sensoriais.....	40
3. Justificativa.....	42
4. Hipótese	43
5. Objetivos	44
5.1. Objetivos específicos.....	44
6. Material e Métodos.....	45
6.1. Mel.....	45
6.2. Resíduos de hidromel	45
6.3. Isolamento de leveduras	45
6.4. Extração de DNA genômico.....	46
6.5. Amplificação e análise da região ITS do DNA ribossomal.....	46
6.6. Purificação.....	47
6.7. Sequenciamento.....	48
6.8. Alinhamento.....	48
6.9. Curva de crescimento	48
6.10. Preparação e fermentação do mosto.....	49
6.11. Parâmetros do Hidromel	49
6.11.1 Sólidos Solúveis (Brix).....	49
6.11.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)	50
6.11.3 Açúcares Redutores.....	50
6.11.4 Teor Alcoólico	50
6.11.5 Extrato Seco.....	51
6.11.6 Extrato Seco Reduzido	51
6.11.7 Acidez Total	51
6.11.8 Acidez Volátil.....	52
6.11.9 Acidez Fixa.....	52
6.11.10 Cinzas	52
6.12. Análise dos constituintes voláteis.....	52
6.13. Análise sensorial	53

7.	Resultados e Discussão.....	55
7.1.	Seleção e identificação de leveduras.....	55
7.2.	Curva de Crescimento.....	58
7.3.	Processo fermentativo.....	61
7.4.	Caracterização físico-química do Hidromel	64
7.5.	Análise compostos voláteis	69
7.6.	Análise sensorial	74
7.6.1.	Teste de aceitação	76
7.6.2.	Avaliação de intenção de compra	80
7.6.3.	Teste de preferência.....	81
8.	Conclusão	83
9.	Referências	84
	Anexo 1 – Análise similaridade Blast	92
	Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	93
	Anexo 3 – Ficha de avaliação de análise sensorial	95

1. Introdução

O hidromel é uma bebida milenar, produzida a partir da fermentação de uma mistura de mel e água, podendo ser adicionado especiarias, flores, frutas e grãos. O mel que devido a sua baixa umidade não fermenta em condições ambiente, quando armazenado com água torna-se apto a iniciar um processo de fermentação espontânea. Uma das evidências mais antigas de bebida fermentada de arroz, fruta e mel data de 7 mil a.C. na China (MCGOVERN *et al.*, 2004).

Achados arqueológicos em sítios na Áustria e Suécia sugerem o consumo de hidromel cerca de 3 mil anos a.C. (MOE; OEGGL, 2014). Assim como a presença de resíduos de hidroméis em vasos funerários encontrados na Escócia sugerem que nossos ancestrais da idade do bronze tinham o conhecimento da produção de hidromel e possível comércio da bebida (DICKSON, 1978).

Presente nas raízes das civilizações antigas, o hidromel era utilizado em rituais por diversos povos como celtas, egípcios, escandinavos, eslavos, gregos, romanos e por tribos africanas. Alguns povos acreditavam que a imortalidade fosse transmitida por uma bebida fermentada à base de mel: Ambrosia ou Néctar na mitologia grega, Amrita na mitologia védica e Mead na mitologia nórdica. A tradição do termo “lua de mel” evidencia ritos onde o casal recém unido deveria consumir uma bebida fermentada a base de mel para conceber um filho (PEREIRA *et al.*, 2017).

Embora o hidromel estivesse presente em várias culturas, apresentou um declínio de sua popularidade que pode ser justificado pelo aumento da produção agrícola, o que tornou o valor de um fermentado de mel maior que de um fermentado de frutas ou grãos. Fato que contribuiu para a ascensão de bebidas mais acessíveis como cervejas, cidras e vinhos. Atualmente os avanços em pesquisa e processos de produção abrem novas perspectivas de mercado consumidor, principalmente na África, América e Europa (DEMETS, 2020).

O hidromel pode ser uma fonte alternativa para agregar valor ao produto na cadeia do mel, afim de buscar novas soluções para o reaproveitamento de resíduos provenientes da extração de mel (FERNANDES; LOCATELLI; SCARTAZZINI, 2009).

No Brasil a maior parte da produção é realizada por pequenos produtores de forma artesanal e muitas vezes não catalogada. Embora a produção seja regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) existem apenas 36 hidromelarias registradas no país (BRASIL, 2020).

A normativa Nº 34, de 29 de novembro de 2012 estabelecida pelo MAPA preconiza os padrões de identidade e qualidade para bebidas fermentadas, além de estabelecer que o teor alcoólico desta bebida deve estar entre 4 a 14 % ABV (% álcool por volume), entretanto em outros países esse teor pode variar entre 8 e 18 % ABV (BRASIL, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017; BRASIL, 2023).

Os desafios atuais incluem a padronização e popularização do produto no país, visando buscar alternativas para difundir a essa possibilidade e agregar valor ao mel brasileiro. Para tanto, pesquisas sobre os méis e leveduras a serem utilizados, são necessárias para parametrizar os processos fermentativos.

Com o propósito de sanear a falta de padronização no mercado do hidromel brasileiro, bem como compreender as preferências do consumidor, esta pesquisa tem como meta isolar, identificar e selecionar as cepas de leveduras encontradas no mel e no hidromel, caracterizar o hidromel produzido a partir dessas leveduras, estudar as cepas de leveduras selecionadas, definir as condições ideais do processo de fermentação e, por fim, realizar testes sensoriais com o mercado consumidor. Espera-se que essas informações agreguem novos conhecimentos sobre a produção de hidromel e atendam às necessidades crescentes do setor hidromeleiro.

Este trabalho foi dividido em 8 seções, incluindo a presente Introdução, revisão bibliográfica, justificativa, hipótese, objetivos, materiais e metodologias, resultados e discussão e conclusões. A seção de revisão bibliográfica é dividida em subseções que abordam o histórico do hidromel, legislação, pesquisas na área, o mel e as leveduras como matéria-prima, processos fermentativos do hidromel com enfoque em *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*, e por fim os testes sensoriais utilizados.

2. Revisão Bibliográfica

A seção atual traz uma síntese geral, histórico, dados importantes e entendimento da literatura a respeito dos temas fermentação, hidromel, leveduras e mel, reunindo dados representativos da literatura sobre fermentação de hidromel, com enfoque na utilização das leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Hidromel

Presente em diversas civilizações, o hidromel é uma das bebidas fermentadas mais antigas, entretanto ainda é um produto de escassa comercialização (GUPTA; SHARMA, 2009). A dificuldade de acesso ao produto pode ocorrer por não ser uma bebida popular em determinada região, por legislação inexistente ou até mesmo em função do alto custo para regulamentação. Na última década pesquisas têm buscado aprimorar a produção através de desenvolvimento de formulação, fermentação com células imobilizadas e pasteurização (IGLESIAS *et al.*, 2014).

Segundo o site (<https://mead-makers.org/>), da associação de produtores de hidromel dos Estados Unidos, (*The American Mead Makers Association, Inc.*), o número de hidromelarias comerciais nos EUA aumentou de aproximadamente 60 em 2003, para cerca de 200 em 2013 e para cerca de 300 no início de 2016, em 2020 contava com cerca de 450 (AMERICAN MEAD MAKERS ASSOCIATION). Na Europa, a Polônia é o país referência em produção de hidromel, especialmente após 2008, quando seu hidromel recebeu da comissão europeia o selo de especialidade tradicional (*Traditional Speciality Guaranteed*). Segundo o informativo da KPMG, apenas a Polônia foi responsável pela produção de aproximadamente 1 milhão de litros de hidromel no ano de 2013 (KPMG, 2014).

Em países sul americanos como Argentina, Bolívia, Brasil e Peru encontram-se produtores de hidromel na sua maioria artesanais. Através da iniciativa particular de alguns produtores, no ano de 2020 foi criado um mapa virtual de hidromelarias sul americanas e foi constatado que em março de 2022 haviam 384 hidromelarias catalogadas em sua maioria pequenos produtores artesanais (GOOGLE MAPS, 2022).

Segundo informações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2020 haviam 36 estabelecimentos produtores de hidromel registrados no Brasil (BRASIL, 2020). Embora o produto tenha potencial de mercado consumidor, ainda não é tão popular como cervejas e vinhos, talvez pela falta de conhecimento e de estudos tecnológicos para produção em escala industrial.

Na legislação brasileira segundo o Decreto nº 6871 de 4 de julho de 2009 do MAPA regulamenta que o hidromel deve apresentar graduação alcoólica de 4 a 14 % em volume e ser obtido pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável (BRASIL, 2009). Segundo GUPTA e SHARMA (2009), seu teor alcoólico pode variar de 7 a 22 %, enquanto legislação de países europeus autoriza o teor alcoólico entre 8 a 18 % (PEREIRA *et al.*, 2009).

O hidromel é uma bebida produzida a partir da diluição de mel e água e suas proporções variam de 1:0,5 a 1:3 (mel:água) (IGLESIAS *et al.*, 2014). O processo de fermentação realiza-se por leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces* e as diferentes cepas de leveduras enológicas são responsáveis pela variedade da aparência, de aroma e do sabor (SCHULLER; CASAL, 2005). As leveduras utilizadas podem ser provenientes de cepas comerciais ou de seleção de leveduras selvagens naturais do mel e do pólen (DEMETS, 2020).

Apesar de tradicionalmente o hidromel ser caracterizado pela mistura fermentada de mel e água, muitas variações apareceram ao longo do tempo variando de simples às complexas misturas de frutas e especiarias, porém mantidas as características essenciais. A utilização de elementos extras na fabricação do hidromel é usual e deram origem às categorias apresentadas na Tabela 1 (MORAES, 2018).

Tabela 1 - Definição das categorias populares de hidromel.

Categoria	Definição
Braggot	Adição de cereais/grãos
Capsicumel	Adição de pimentas
Cyser	Adição de maçã
Melomel	Adição de frutas
Metheglin	Adição de especiarias
Morat	Adição de amoras
Pyment	Adição de uvas
Rhodomel	Adição de pétalas de rosas
Tradicional	Mel e água

Fonte: Adaptado de MORAES, (2018).

O termo melomel é designado para hidroméis contendo frutas que não se encaixam nas categorias das frutas mais utilizadas como amora, maçã e uva. Na composição dos metheglin pode-se encontrar as especiarias, ervas e temperos, usualmente anis, canela, cravo, hibisco, lúpulo e manjeriço. Os hidroméis que levam cereais maltados como centeio, cevada ou trigo, são conhecidos como braggot. Assim como, ingredientes tidos como exóticos podem ser utilizados a exemplo do rhodomel que conta com aromatizantes provenientes de pétalas de rosas, enquanto o capsicumel contém pimentas em sua composição (IGLESIAS *et al.*, 2014; MORAES, 2018; DEMETS, 2020).

O hidromel pode apresentar variações de acordo com o tempo de fermentação, quantidade e qualidade do mel utilizado na diluição, escolha da levedura e da graduação alcoólica. Pode ser classificado em doce, espumoso, licoroso ou seco, segundo a sua tecnologia de fabricação (RAMALHOSA *et al.*, 2011). Sack é um exemplo de hidromel com maior quantidade de mel e, conseqüente graduação alcoólica superior ao tradicional. Além das variações de mel, outra variável na produção resulta em hidromel frisante ou espumante, no qual o dióxido de carbono dissolvido no produto se faz essencial, podendo ser decorrente da segunda fermentação realizado após o engarrafamento da bebida ou do processo de carbonatação (IGLESIAS *et al.*, 2012).

A legislação brasileira dispõe de padrões de identidade e qualidade para hidromel especificadas na Tabela 2 (BRASIL, 2012).

Tabela 2 - Padrões de identidade e qualidade para hidromel segundo legislação brasileira (MAPA).

Parâmetros	Limite mínimo	Limite máximo	Classificação
Acidez fixa (mEq/L)	30	---	---
Acidez total (mEq/L)	50	130	---
Acidez volátil (mEq/L)	---	20	---
Anidrido sulfuroso total (g/L)	---	0,35	---
Cinzas (g/L)	1,5	---	---
Cloretos totais (g/L)	---	0,5	---
Graduação alcoólica (% v/v a 20 °C)	4	14	---
Extrato seco reduzido (g/L)	7	---	---
Teor de açúcar (g/L)	---	≤ 3	Seco
	> 3	---	Suave

Fonte: Instrução normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012 (MAPA).

Para melhorias da qualidade na produção de hidromel são utilizados suplementos nutricionais com o objetivo de otimizar as condições de fermentação. Os ácidos originários do mel podem interferir no pH do mosto além de comprometer a taxa de fermentação, uma vez que o mel apresenta deficiência em nutrientes utilizados pelas diferentes cepas de leveduras (GUPTA; SHARMA, 2009). Por tanto, se faz necessário a adição de nutrientes como ácidos cítrico, láctico e/ou tartárico, bicarbonato de potássio, carbonato de cálcio ou cloreto de magnésio, estando o uso desses aditivos previsto na legislação brasileira.

Uma alternativa para produção de hidromel com utilização de matéria prima de baixo custo é o hidromel feito a partir do melato de cana, que ainda tem potencial para se tornar uma bebida de alta qualidade quando se enquadrar nos parâmetros estabelecidos na legislação brasileira, sendo necessário mais estudos para melhorá-lo na questão da acidez fixa, podendo trazer ganhos maiores aos produtores de hidromel (MORALES; ALCARDE; DE ANGELIS, 2013).

2.2. Mel

Definido como líquido viscoso e açucarado, o mel é um produto de origem animal produzido por abelhas melíferas a partir do néctar de flores. Suas características são variáveis e influenciadas por diversos fatores a exemplo das condições climáticas e fatores ambientais como: fonte floral, origem geográfica e fonte de processamento (IGLESIAS *et al.*, 2012; MEO *et al.*, 2017; MACHADO DE-MELO *et al.*, 2018). Os diferentes fatores refletem na diversidade das características físico-química dos méis, na cor, odor e sabor, essa ampla variabilidade expande as opções de produtos, porém reduz a padronização dos mesmos.

Foram identificados mais de três centenas de compostos voláteis no mel avaliado por BARRA e colaboradores, compostos esses responsáveis por criar perfis químicos de identidade de cada mel, entre eles ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres e terpenos. O comprimento das cadeias de carbono dos ácidos carboxílicos proporciona sabores diferentes que podem variar de picante a rançoso (BARRA *et al.*, 2010). O alto teor de hidrocarbonetos pode conferir aromas de fruta madura e especiarias, enquanto os álcoois metilados proporcionam frescor ao mel (CASTRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2009). Conforme estudo realizado por MOREIRA *et al.*, 2010, pode haver

modificações no perfil dos compostos voláteis durante o armazenamento do mel por longos períodos.

Embora o mel apresente uma composição nutricional complexa, é predominantemente constituído por carboidratos (cerca de 60 a 85 %) e água (de 12 a 23 %), além de outros componentes, ácidos orgânicos, compostos voláteis, minerais, proteínas, vitaminas, e diversas substâncias bioativas que afetam as características sensoriais e físicas (MACHADO DE-MELO *et al.*, 2018). A maior parte dos carboidratos cerca de 75 % são monossacarídeos (frutose e glicose) e 10 % são dissacarídeos (maltose e sacarose). Além do mais, a alta concentração de açúcares é responsável pelas propriedades físicas do mel, tais como: capacidade de granulação, densidade, higroscopicidade, valores calóricos e viscosidade (SE *et al.*, 2019).

A umidade é um parâmetro de qualidade relacionado à validade e grau de maturação do mel, quando acima de 20 % promove um ambiente favorável à fermentação por microrganismos presentes no mel (MACHADO DE-MELO *et al.*, 2018).

A quantidade de água no mel depende também dos fatores climáticos e época da colheita, que influenciam diretamente na viscosidade do mel. Importante ressaltar que o excesso de água em sua composição prejudica o armazenamento e a preservação comprometendo sua estabilidade e podendo levar a fermentações indesejadas e granulação (PEREIRA, 2008).

O padrão do controle de qualidade do mel, vigente na legislação brasileira, é regulamentado pelo MAPA através da Instrução Normativa Nº11 de 20/10/2000 que estabelece parâmetros de maturidade, pureza e armazenamento indicados na Tabela 3 (BRASIL, 2000).

Tabela 3 - Parâmetros do mel floral vigentes na legislação brasileira.

Parâmetro	Mel Floral
Acidez	Máximo 50 mEq/Kg
Açúcares redutores	Mínimo 65 %
Atividade diastásica	Mínimo 8 na escala Göthe
Hidroximetilfurfural (HMF)	Máximo 60 mg/Kg
Minerais (cinzas)	Máximo 0,6 %
Sacarose aparente	Máximo 6,0 %
Sólidos insolúveis em água	Máximo 0,5 % *Prensado
Umidade	Máximo 20,0 %

Fonte: Instrução Normativa Nº 11, de 20/10/2000, MAPA.

O teor máximo de umidade permitido é de 20 % (20 g / 100 g) (BRASIL, 2000). Índices superiores podem evidenciar uma coleta prematura do mel em um momento em que os favos não estavam totalmente maduros/operculados, também pode ser indicio de adulteração pelo acréscimo de água. Como consequência dessa condição, é propicia a ocorrência de fermentação do mel ao longo da sua estocagem (NAYIK; DAR; NANDA, 2016).

Os açúcares redutores (glicose e frutose) são as frações de carboidratos predominantes no mel, seu teor deve ser de no mínimo 65 % (65 g / 100 g), enquanto a sacarose tem o máximo tolerado de 6 % (6 g / 100 g) (BRASIL, 2000). Os açúcares redutores e a sacarose são importantes parâmetros indicadores de maturidade dos méis, pois a sacarose provinda do néctar é convertida especialmente na frutose e glicose por enzimas, como a α e β -glicosidase e invertase, altos teores de sacarose e baixos teores de açúcares redutores são um indicativo de colheita precoce do mel, de alimentação artificial ou ainda de adição direta de sacarose (SE *et al.*, 2019).

Em relação à matéria seca do mel, os carboidratos correspondem entre 95 % e 99 % do total da composição do mel, sendo que os principais citados, glicose, frutose e sacarose, tem suas proporções variáveis de acordo com a fonte do néctar. A proporção de frutose em relação a glicose afeta diretamente o sabor e perfil aromático do mel, conferindo mais ou menos caráter frutado dependendo dessa proporção. A qualidade do mel é analisada pelo aroma, cor e umidade em sua composição (PEREIRA, 2008).

Concentrações de frutose abaixo de glicose indicam uma cristalização rápida, enquanto concentrações acima são sugestivos de uma cristalização lenta ou inexistente. De modo geral, a frutose se apresenta em concentrações levemente superiores as da glicose (DOBRE *et al.*, 2012).

Outro composto de extrema importância para o mel são os ácidos orgânicos, que constituem cerca de 0,57 % do mel, como os ácidos cítrico, glucônico, pirúvico entre outros, sendo responsáveis pela acidez do mel e relacionados ao seu sabor característico. Acidez excessiva pode indicar fermentações indesejadas e, embora importante para seu sabor característico, uma vez acima do limite pode comprometer a qualidade do mel. Este parâmetro, inclusive, é regulado na legislação vigente (PEREIRA, 2008).

A acidez máxima permitida é 50 mEq/Kg (BRASIL, 2000). Os métodos utilizados para verificação são a titulação com auxílio de um pHmetro ou titulação com

hidróxido de sódio. Geralmente, méis frescos apresentam pH ideal em torno de 5.5, a acidez acima do permitido pode indicar fermentação, ou adulteração por xarope de sacarose, sendo necessária a análise conjunta de outros parâmetros para a confirmação (BERGAMO *et al.*, 2019).

Um problema comumente encontrado nos méis, devido ao seu alto valor e benefícios, são as adulterações, através da adição de adoçantes mais baratos em sua composição. Há algumas técnicas de detecção de fraudes no mel, como a análise de isótopos de carbono, cromatografia, técnicas de espectroscopia, entre outras. O ideal para detecção de fraudes no mel é a utilização de técnicas que permitam uma análise da autenticidade de forma fácil, barata e rápida. Nesse sentido, a tecnologia de biossensores parece ser a melhor opção para detecção de fraude, pelo fato de ser simples de realizar, precisa e não se faz necessário a utilização de reagentes caros para sua detecção (SE *et al.*, 2019)

O parâmetro de diástase está relacionado com a atividade enzimática no mel, principalmente α e β -amilase, sua determinação é realizada por meio de análise quantitativa, onde uma unidade diastásica corresponde a atividade enzimática de 1 g de mel, o qual pode hidrolisar 0,01 g de amido em 1 h a 40 °C, sendo os resultados expressos em unidades de diástase, Schade ou Göthe (SAKAČ; SAK-BOSNAR, 2012).

A atividade enzimática no mel é variável e depende de vários fatores como aquecimento e estocagem prolongada, fatores estes que decrescem a atividade diastásica dos méis. Sendo assim, a legislação nacional prevê limite mínimo de 8 unidades de diástase (BRASIL, 2000).

O hidroximetilfurfural (HMF) está presente naturalmente em pequenas quantidades no mel, e é um produto intermediário não enzimático formado a partir da redução de açúcares, embora sua análise seja um bom indicador para adulteração por via de incorporação de açúcares invertidos, um alto nível de HMF pode também estar relacionado com aquecimento e o armazenamento prolongado (SE *et al.*, 2019). O HMF é considerado tóxico em determinadas concentrações, o que reforça a importância dos limites máximos estipulados, que na legislação em vigor é de 60 mg/Kg (BRASIL, 2000).

Os minerais estão presentes no mel em pequenas quantidades e mudam de acordo com o tipo de mel, podendo variar de 0,04 % em méis claros para 0,2 % em méis escuros, sendo o potássio o mineral mais abundante, estando presente também

o cálcio, cobre, fósforo e manganês. Essa colocação, bem como a concentração de minerais, pode variar de acordo com o conteúdo de cinzas, que depende de sua origem, geografia e pode ter relação com a poluição ambiental (RAMALHOSA *et al.*, 2011).

O teor de cinzas representa a quantidade de resíduo mineral contido no mel, e é considerado um parâmetro de pureza por alguns órgãos regulamentadores, sendo permitido o máximo de 0,6 % (0,6 g / 100 g) (BRASIL, 2000). Algumas etapas do beneficiamento do mel podem ser mal conduzidas gerando material inorgânico (como sujidades) agregado ao produto, aumentando assim os níveis desse parâmetro (COSTA SANTOS; DE OLIVEIRA, 2013).

A Tabela 4, adaptada de BOGDANOV e colaboradores (2008), apresenta os valores médios, mínimo e máximo, dos principais componentes do mel:

Tabela 4 - Componentes do mel, valores médio, mínimo e máximo, expressos em g / 100 g (%).

Componentes	Valor Médio	Mínimo-Máximo
Ácidos	0.5	0.2 – 0.8
Aminoácidos, proteínas	0.3	0.2 – 0.4
Erlose	0.8	0.56
Frutose	38.2	30 – 45
Glicose	31.3	24 – 40
Melezitose	<0.1	–
Minerais	0.2	0.1 – 0.5
Outros Dissacarídeos	5.0	28
Outros Oligossacarídeos	3.6	0.5 – 1
Sacarose	0.7	0.1 – 4.8
Teor de umidade	17.2	15 – 20
Total açúcares	79.7	–

Fonte: Adaptado de BOGDANOV *et al.*, (2008).

Os sólidos insolúveis estão relacionados a resíduos presentes no mel como asas das abelhas, cera, pernas e outras sujidades, podendo ser indicativo de processamento inadequado, uma vez que podem ser evitados por filtração adequada (COSTA SANTOS; DE OLIVEIRA, 2013). Os órgãos regulamentadores determinam

limites de máximos para esse parâmetro de 0,5 % (0,5 g / 100 g) em méis prensados e 0,1 % em méis centrifugados (BRASIL, 2000).

Os compostos voláteis são mais de 300, pertencentes aos grupos de ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, que indicam a fonte de origem do mel, além dos compostos fenólicos, que são compostos secundários, representados principalmente por ácidos fenólicos e flavonoides (RAMALHOSA *et al.*, 2011).

Além de alimento, o mel tem demonstrado atividade anticâncer, antidiabética, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante e antiviral (CIANCIOSI *et al.*, 2018). Características como alto teor de açúcar, baixas umidade, presença de peróxido de hidrogênio, ácidos fenólicos e flavonoides podem ser responsáveis pela atividade antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus aureus* (DŽUGAN *et al.*, 2018). A estes compostos fenólicos foi atribuída a atividade antioxidante e podem interferir na coloração dos méis, sugerindo que méis mais escuros apresentem maior quantidade de compostos fenólicos, logo, maior atividade antioxidante (SE *et al.*, 2019).

Mundialmente, a China lidera a produção mundial de mel, tendo no ano de 2018 produzido 24 % da produção total de mel no mundo, devido ao seu baixo custo de produção, o seu clima favorável para apicultura, a vasta área de terra cultivável e a grande população de abelhas. Entretanto, seus preços baixos demonstram a necessidade de agregar valor ao produto, já que o país ainda tem a necessidade de importar mel de valor mais elevado para abastecer seu mercado. A China é seguida na lista dos maiores produtores por Turquia e Argentina (VIDAL, 2020).

Em contraponto, com os baixos preços da China, a Nova Zelândia, com menos de 1 % da produção mundial, é vice-campeã de faturamento com a venda de mel, devido ao alto valor agregado de seus produtos, considerados de alta qualidade, sendo inclusive um dos países que exporta sua produção para a China. Em 2020, a produção mundial ficou em 1.905.028 toneladas de mel, sendo que 446.900 toneladas foram produzidas pela China (VIDAL, 2020).

Dados de setembro de 2020, apontam que foram exportadas pelo Brasil, 4.476,2 toneladas de mel *in natura*. Este mesmo produto, apareceu em 10º lugar no ranking de exportação do descritivo agropecuário em setembro de 2021, com 572 toneladas exportadas (BRASIL, 2022).

O Brasil possui a maior capacidade de produção de mel orgânico do mundo, pois grande parte da produção é proveniente de áreas de vegetação nativa. Apesar

da sua alta qualidade, a produção brasileira sofre com a concorrência de produtos com preços mais baixos, como a China, o que vem dificultando as exportações do produto brasileiro (VIDAL, 2020).

O Brasil se destaca na produção mundial de mel, e foi o sexto maior exportador de mel *in natura* em 2019, segundo a Associação Brasileira de Exportadores de Mel (ABEMEL, 2023) estima-se que em 2019 o país produziu 46 mil toneladas de mel, sendo 30 mil toneladas destinadas à exportação. Apesar da posição de destaque na produção mundial de mel, ainda existe potencial de expansão para a produção, de acordo com dados da Confederação Brasileira de Apicultura (CBA).

Os apicultores brasileiros são predominantemente de pequeno porte, pois quase metade dos produtores possuem até 50 colmeias, enquanto os grandes produtores mais de 90 % possuem até 200 colmeias sendo estes últimos os responsáveis por 60,2 % da produção nacional de mel (VIDAL, 2020).

Apesar de grande parte da produção ser destinada à exportação, o valor pago ao produtor pelo quilo de mel é menor do que o valor pago pelo mercado interno.

Muitas vezes o produto volta para o apicultor devido a problemas como cristalização do produto, tendo-se assim o mel de descarte. Além dos resíduos gerados a partir da lavagem dos materiais, o descarte dos resíduos da extração do mel no meio ambiente pode ser um risco para as abelhas, pois elas podem consumir o produto fermentado e morrer, causando prejuízos aos apicultores e à flora. Deste modo, o desenvolvimento de produtos derivados do mel parece ser uma alternativa sólida para aumentar o lucro da indústria apícola (IGLESIAS *et al.*, 2014). Neste contexto, a produção de hidromel pode ser uma opção economicamente rentável aos apicultores, tendo em vista seu maior valor agregado. No entanto, existe a necessidade de promover qualificação na tecnologia de produção da bebida, o que proporcionará um reflexo positivo na qualidade química, sanitária e sensorial da bebida comercializada.

2.3. Leveduras

As leveduras são microrganismos eucariotos pertencentes ao Reino Fungi e sua morfologia pode se apresentar alongada em pseudomicélio, cilíndrica, esférica, ovoide e pera. Comumente a reprodução é assexuada por brotamento, porém em situações de estresse nutricional a reprodução sexual, por conjugação, é uma via

alternativa que origina células diploides capazes de se reproduzir posteriormente por brotamento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Essas, são caracterizadas como organismo anaeróbio facultativo, ou seja, na presença de oxigênio respiram aerobicamente, onde metabolizam hidratos de carbono e produzem dióxido de carbono e água; enquanto, na ausência de oxigênio, fermentam os hidratos de carbono e produzem dióxido de carbono e etanol (FERNANDES; LOCATELLI; SCARTAZZINI, 2009).

As características organolépticas das bebidas alcoólicas, como aroma e sabor, estão diretamente relacionadas com o tipo de levedura empregada no processo fermentativo. O etanol é o principal produto excretado pelas leveduras durante a fermentação; entretanto, os compostos que conferem aroma e sabor à bebida são formados por meio do metabolismo secundário da levedura (GUERRA, 2010). Esses compostos são produzidos como forma de desintoxicação celular, principalmente os álcoois superiores e ésteres, que são responsáveis pelos aromas frutados, florais e balsâmicos (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010). Os efeitos prejudiciais do etanol no crescimento de leveduras incluem um aumento da permeabilidade da membrana e inibição de uma série de enzimas essenciais (STEWART, 2016).

As diferentes linhagens de leveduras, mesmo que de uma mesma espécie podem produzir diferentes perfis de compostos aromáticos e voláteis, responsáveis pelas características finais do hidromel (PEREIRA *et al.*, 2009, 2017).

Embora ocorra baixa oferta de linhagens de leveduras específicas, as leveduras empregadas no processo de fermentação do hidromel são na sua grande parte do gênero *Saccharomyces* utilizadas para produção de vinhos e sidras, selecionadas por apresentar alta velocidade de fermentação, boa floculação e tolerância à elevadas concentrações de álcool, açúcares e ácidos orgânicos (VENTURINI FILHO, 2021).

A seleção de leveduras para produção de hidromel busca a propagação de cepas eficientes, além de baixa produção de aromas indesejáveis (*off flavours*), redução na produção de dióxido de enxofre, sulfureto de hidrogênio e acidez volátil, assim como baixos níveis de acetaldeído e ausência de amins biogênicas (MILESKI, 2016).

Para a produção de hidromel é necessário um controle do processo de fermentativo, pois as leveduras podem sofrer a interferência de condições de estresse,

como baixos valores de pH ou altas concentrações de etanol e açúcares totais (PEREIRA, 2008).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são amplamente empregadas nas indústrias de alimentos, bebidas, biomassas e compostos aromatizantes, sendo consideradas seguras para consumo. São utilizadas de forma comercial pela indústria de bebidas fermentadas devido a sua capacidade de produzir etanol, a partir de um ou mais tipos de açúcares por meio de fermentação anaeróbica (STEWART, 2016).

ILHA *et al.* (2008) realizaram avaliação do rendimento e da eficácia da fermentação alcoólica na produção de hidromel, com a utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, fermentando 5 litros de hidromel a partir de 1 kg de mel, a um teor alcoólico de 8 % (v/v). O rendimento da fermentação foi de 41,53 % e a eficácia de 81,27 %.

Outros estudos focaram no comparativo de diferentes espécies de *Saccharomyces* e outra levedura não *Saccharomyces*, como SOTTIL *et al.* (2019) que obtiveram diferenças significativas no perfil químico de três leveduras de vinho (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota delbueckii*) para produção de hidromel. As leveduras - do gênero *Torulaspota delbueckii* apresentaram menor teor de etanol, porém maior teor de açúcar residual, sendo ideal para produção de hidroméis mais doces. Enquanto as *Saccharomyces bayanus* seria indicada para a produção de hidroméis secos, pois apresentaram menor teor de açúcar residual entre os testados (SOTTIL *et al.*, 2019).

SILVA (2016) realizou isolamento de leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* a partir de mel e pólen de abelhas, que foram submetidas a estresse de 5 % de etanol (v/v) e 20 % de glicose (m/v). As linhagens de *Saccharomyces* e *Rhodotorula* foram avaliadas quanto à tolerância as condições de estresse submetidas além de diferentes temperaturas. As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram maior rendimento em etanol e maior tolerância a uma temperatura ideal para fermentação de 20 °C.

LOPES *et al.* (2020) comparou a utilização de um inóculo isolado de *Saccharomyces cerevisiae* com um inóculo misto com *Meyerozyma caribbica* na produção de hidromel, no que diz respeito a composição química e a qualidade sensorial da bebida. Ambos produtos apresentaram graduação alcoólica semelhante em torno de 12 % (v/v), entretanto, diferentemente do esperado, o hidromel com

inóculo misto, apresentou redução dos compostos voláteis, principalmente ésteres, influenciando assim nos escores de aroma, sabor e intenção de compra.

A inoculação mista também foi estudada para a fermentação de vinho branco, a fim de se determinar o impacto nos compostos voláteis e aromáticos. A fermentação mista melhorou a composição de compostos aromáticos, em especial de certos acetatos e compostos do grupo etil, bem como, em análises sensoriais realizadas, acentuou características cítricas, de frutas doces, ácidas, silvestres e florais, demonstrando que, na fermentação mista das leveduras *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae*, pode se ter benefícios em relação a qualidade e sabor da bebida (WANG *et al.*, 2017).

Embora a utilização de leveduras não *Saccharomyces* na fermentação traga alternativas para diversificar o caráter aromático das bebidas, ou mesmo melhora-lo, as leveduras *Saccharomyces* se mostram essenciais para alcançar uma fermentação bem-sucedida, podendo ser utilizado o conjunto de leveduras para diferentes perfis de bebidas (GAMERO *et al.*, 2020).

Leveduras selvagens ainda são pouco exploradas na fermentação. Duas linhagens de *Torulaspora delbrueckii* isoladas de abelhas foram utilizadas para fermentação de hidromel, e ambas demonstraram ser capazes de metabolizar o açúcar do mel apresentando inclusive melhores pontuações em testes sensoriais. Quando inoculadas de forma conjunta com *Saccharomyces*, foram capazes de fermentar rapidamente o mel em escala industrial, além de gerar um perfil aromático superior, quando comparado com o uso de *Saccharomyces cerevisiae* isolada (BARRY *et al.*, 2018).

Esses exemplos demonstram que é possível explorar outras linhagens de leveduras para fermentação, pois, além de trazer diversidade ao produto, sem perder sua capacidade fermentativa usual, podem agregar valor e qualidade as bebidas fermentadas.

BURA; VAJZOVIC; DOTY (2012) compararam a fermentação de açúcares entre leveduras de *Candida guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, já amplamente estudadas e utilizadas na produção de xilitol. Esta última demonstrou capacidade de metabolizar hexoses e produzir etanol e xilitol, além de apresentar tolerância aos compostos resultantes da fermentação.

LI e SUN (2019) analisaram o efeito do uso de diferentes tipos de méis e de diferentes leveduras no perfil aromático, composição e qualidade do hidromel. Foram

preparadas diferentes variedades de hidromel e inoculadas leveduras do tipo *Kluyveromyces thermotolerans* e *Torulaspota delbrueckii*. Essas espécies de leveduras e variedades de méis afetaram diretamente as concentrações de compostos voláteis, perfil aromático, teor alcoólico e composição físico-química do hidromel. Um dos méis utilizados, o 'Vitex', em combinação com a levedura *K. thermotolerans*, apresentou a maior graduação alcoólica entre os hidroméis produzidos. De maneira geral, diferentes tipos de méis e leveduras trazem o aprimoramento no resultado final do hidromel, em sua composição, perfil aromático e graduação alcoólica.

Um estudo realizou a caracterização do mel de abelhas sem ferrão (*Melipona scutellaris*) e, embora se tenha encontrado uma bebida com atividade antioxidante semelhante a outras bebidas, o hidromel de classificação seco continha acidez volátil acima do estabelecido pela legislação, enquanto o hidromel de classificação doce apresentou teor alcoólico acima dos níveis estabelecidos. Os autores sugerem readequação da legislação para beneficiamento e valorização da produção de um mel diferenciado (CAVALCANTE DA SILVA *et al.*, 2018).

2.4. Identificação molecular de leveduras

As metodologias clássicas para a identificação de leveduras baseiam-se nas características morfológicas, sexuais, fisiológicas e nutricionais, entretanto exigem um grande volume de testes que podem não ser totalmente conclusivos, especialmente quando é necessária a identificação de cepas pertencentes à mesma espécie, deste modo, as técnicas de biologia molecular são de extrema relevância para uma identificação precisa (CARVALHO *et al.*, 2010).

Variações fenotípicas são resultantes de polimorfismos genéticos que podem ocorrer em sequências codificadoras e não codificadoras do DNA, sendo assim técnicas baseadas na análise de polimorfismos vem sendo utilizadas com objetivo de identificação de leveduras, como a análise do padrão de proteínas, polimorfismos na sequência do DNA, cariotipagem por meio do uso da eletroforese de campo pulsado, análise de restrição do DNA mitocondrial, entre outras (SILVA; BATISTOTE; CEREDA, 2013).

Os diferentes genes do DNA ribossomal (5S, 5,8S, 18S e 26S), responsáveis pela formação das sub-unidades dos ribossomos, apresentam-se separados por

regiões espaçadoras conhecidas como *Internal Transcribed Spacer* (ITS), que embora transcritas não são traduzidas para as subunidades do RNA ribossomal. A identificação baseada em metodologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornou-se comum por causa da relativa facilidade de manipulação e alta reprodutibilidade (DE SOUZA LIBERAL, 2005).

O método da PCR utiliza uma amostra de DNA que contenha a região de interesse a ser amplificada, dois *primers* iniciadores que flanqueiam a região “alvo”, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) que estendem as novas cadeias na presença de uma enzima polimerase termoestável, como a *Taq* DNA polimerase. Os componentes da PCR são misturados simultaneamente e submetidos ao equipamento termociclador à sucessão de três etapas: a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão do DNA. No primeiro passo, a altas temperaturas (90-95 °C) permitem a desnaturação do DNA fita dupla em duas fitas simples, o posterior resfriamento (55-57 °C) possibilita que os *primers* se anelem na posição 5' de cada fita simples do DNA molde, e então, uma nova elevação de temperatura (72 °C) promove a etapa de extensão entre os pontos de anelamento dos *primers*, sintetizando assim novas fitas de DNA. A repetição das três etapas constitui os ciclos de reação em cadeia da polimerase (PCR) gerando inúmeras cópias a partir das fitas de DNA recém-sintetizadas (ROSA *et al.*, 2003). Os fragmentos gerados são posteriormente visualizados em gel de agarose após processo de eletroforese.

A análise do comprimento do produto da PCR das regiões ITS1 e ITS2 permite identificar diferentes tipos de leveduras de forma rápida, entretanto, várias espécies podem apresentar produtos de amplificação com o mesmo tamanho, sendo assim faz-se necessário o sequenciamento dos genes ribossomais após amplificação por PCR, o que permitirá a identificação das leveduras em nível de espécie. As sequências ribossomais obtidas são normalmente depositadas pelos pesquisadores em bases de bancos de dados de genes, como DDBJ, EMBL ou Genbank, a comparação das sequências obtidas com as do banco de dados permite que o organismo possa ser identificado, além de gerar um alinhamento com sequências mais similares dentro de limites predefinidos (ROSA *et al.*, 2003).

Outro método de identificação de espécies foi criado em 1977 por Sanger, e baseia-se no sequenciamento de genes e genomas. Esse método é realizado através da incorporação de desoxinucleotídeos e didesoxinucleotídeos marcados, à uma cadeia de DNA em crescimento utilizando um molde de DNA alvo que se deseja

sequenciar. Após a incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados a extensão da cadeia é interrompida gerando fragmentos de diferentes tamanhos, então os fragmentos são organizados do menor ao maior tamanho e submetidos a leitura por meio de fluorescência, identificando assim a sequência das bases nitrogenadas na cadeia de DNA. Esse método de sequenciamento sofreu evoluções, mas continua sendo, ainda hoje, o método de tecnologia que gera dados de melhor confiabilidade e qualidade (CHEN *et al.*, 2001).

2.5. Processos fermentativos

Para a produção de hidromel, é necessário um controle rigoroso da fermentação, pois algumas leveduras podem não se adaptar as condições de estresse, como as concentrações de etanol, baixos valores de pH ou níveis de açúcar elevado (PEREIRA *et al.*, 2009).

Ainda, na fermentação de hidromel se busca evitar fermentações secundárias indesejadas que podem aumentar a acidez volátil e afetar a qualidade, o sabor e o perfil aromático do hidromel. Portanto, é necessário selecionar estirpes tolerantes às condições que são submetidas (PEREIRA *et al.*, 2009).

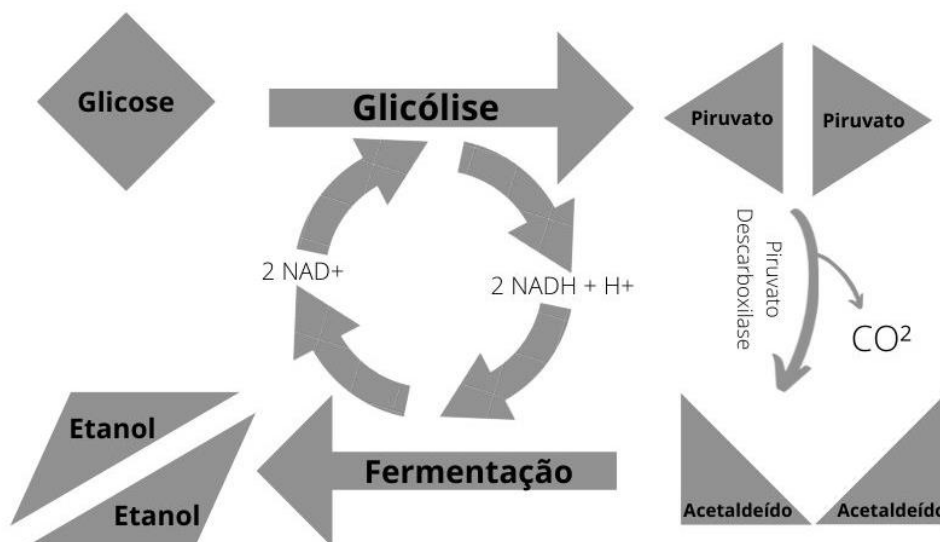
Outro grande desafio na produção do hidromel é a falta de padronização, devido às características únicas de cada mel e levedura. A produção no Brasil ainda é dominada por pequenos produtores, que muitas vezes se utilizam de leveduras selvagens que podem alterar o perfil aromático do hidromel produzido (SILVA, 2016).

Nos primórdios, o hidromel originou-se da fermentação espontânea por leveduras selvagens presentes no mel ou em cascas de frutas adicionadas ao processo. Embora esse tipo de fermentação tenha um papel importante como fonte de novas cepas de leveduras aptas ao melhoramento e seleção, atualmente os avanços biotecnológicos e as produções em escala comercial, utilizam-se de leveduras comerciais selecionadas a fim de atingir uma padronização do processo (MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2009; SROKA; TUSZYŃSKI, 2007).

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são frequentemente utilizadas para os processos fermentativos que resultam no hidromel. Essa levedura se sobressai diante das demais por sua capacidade de fermentação, rápido crescimento em condições anaeróbicas e elevada tolerância ao etanol e outros compostos produzidos

(MOLINET; CUBILLOS, 2020). Em condições anaeróbicas, o ácido pirúvico gerado a partir da glicólise é descarboxilado e resulta na produção de gás carbônico (CO₂) e acetaldeído, o qual é reduzido pela coenzima NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) produzindo etanol (Figura 1) (WALKER; WALKER, 2018).

Figura 1 - Reações enzimáticas terminais de fermentação de levedura.



Fonte: Adaptado de WALKER; WALKER (2018).

A fermentação ocorre em três fases: Fase inicial, onde os microrganismos se adaptam ao ambiente e iniciam sua multiplicação, há uma quantidade de oxigênio disponível para auxiliar no desenvolvimento das leveduras; Fase tumultuosa, onde há uma rápida multiplicação das leveduras e o dióxido de carbono é liberado com borbulhamento intenso, na qual a floculação e temperatura tendem a aumentar; Fase estacionária, onde ocorre a precipitação do fermento, ocorrendo a redução no crescimento das leveduras e produção de CO₂ (NEVOIGT, 2008).

Em um processo fermentativo, aproximadamente 90 % dos açúcares são transformados em etanol e os outros 10 % restantes em glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores e outros constituintes diversos em quantidades ínfimas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Para um melhor desempenho da fermentação do hidromel é necessário encontrar e isolar cepas de leveduras adequadas para a composição específica do mosto de mel ou associadas às condições de estresse encontradas, entre os quais alta osmoticidade, baixa concentração de nutrientes essenciais, baixo teor de minerais, baixo pH e baixa capacidade tampão (IGLESIAS *et al.*, 2014).

No que tange ao hidromel, grande parte dos problemas de fermentação são resultantes da deficiência de nitrogênio, minerais e outros fatores de crescimento derivados do mel (GUPTA; SHARMA, 2009; RAMALHOSA *et al.*, 2011). A deficiência de nitrogênio foi reportada como a maior causa de fermentações lentas ou parada fermentativa em vinificações (BELTRAN *et al.*, 2005; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010), já que o nitrogênio é um macroelemento essencial a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares influenciando assim o crescimento da levedura, a taxa de fermentação e a duração do processo fermentativo (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990). A concentração de nitrogênio também regula a formação de subprodutos, tais como sulfeto de hidrogênio (H₂S), ácidos graxos, álcoois superiores e seus ésteres, entre outros, que afetam as propriedades sensoriais das bebidas alcoólicas (CRÉPIN *et al.*, 2012; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010; TORREA *et al.*, 2011).

A partir do exposto, fica claro que, a correção das deficiências nutricionais pode reduzir o estresse da levedura, melhorando seu desempenho no processo fermentativo (GIBSON, 2011).

A quantidade de inóculo também pode influenciar no processo fermentativo do hidromel. Quanto maior o inóculo (10⁸ UFC/mL), menor será o tempo de fermentação; entretanto, a clarificação do hidromel é prejudicada. Em contrapartida, o uso de menor concentração de inóculo (10⁵ UFC/mL) resulta em uma bebida com maior concentração de compostos que interferem benéficamente no perfil aromático, tais como álcoois superiores, ésteres, fenóis voláteis (PEREIRA *et al.*, 2014). De acordo com SROKA e TUSZYNSKI (2007), a fração de levedura seca ativa para iniciar a fermentação não deveria ser inferior a 0,5 % m/v, enquanto GUPTA e SHARMA (2009) trabalharam com concentrações de 3 a 5 % m/v. Atualmente recomenda-se a utilização de fermento seco comercial na concentração entre 0,20 e 0,30 g/L (BEDNAREK *et al.*, 2019).

O problema da falta de padronização e não uniformidade do produto final foi estudado com o objetivo de otimizar o hidromel através de adição de formulação para melhorar o desempenho da fermentação da levedura e obter um produto de alta qualidade. Entre outros aditivos, foi utilizada suplementação de nitrogênio, adição de ácidos orgânicos, e difosfato de amônio. A adição de fosfato acelerou o processo de fermentação, entretanto, a fermentação não foi suficiente para metabolizar todo o açúcar e completar o processo fermentativo. A Adição de nitrogênio foi associada a

maiores teores de ésteres etílicos e acetato, podendo ressaltar o caráter frutado do produto (MENDES-FERREIRA, 2010).

STEINKRAUS e MORSE (1966) realizaram um amplo estudo dos fatores que influenciam a fermentação para produção de hidromel. Para tanto, foi realizado testes sensoriais nos quais, se analisou a velocidade da fermentação, o pH ideal de fermentação, a temperatura utilizada para fermentação das leveduras, e os tipos de méis utilizados para produção de hidromel. O pH desejável de fermentação encontrado no estudo ficou entre 3,7 – 4,6, sendo que abaixo dessa apresentava uma taxa de fermentação muito lenta. A nível de pH 3,7, apresentava boa taxa de fermentação, mas era ainda baixo para inibir crescimento de bactérias indesejáveis. No pH adequado e com os fatores de crescimento adicionados, a fermentação pode ser completa em duas semanas, a no máximo duas semanas e meia (STEINKRAUS; MORSE, 1966).

Em relação a temperatura, a taxa de fermentação demonstrou aumentar conforme aumentava a temperatura, até em torno de 35 a 37 °C, onde a taxa estabilizada e, a partir disso, começava a cair. Entretanto, se a temperatura fosse elevada acima da ideal, a fermentação, mesmo sendo mais rápida, se encerrava antes da fermentação completa do açúcar. A temperatura ideal encontrada ficou entre 24-27 °C, onde a taxa de fermentação era rápida o suficiente e acontecia por completo (STEINKRAUS; MORSE, 1966).

No estudo conduzido por esses mesmos autores, comparou-se os tipos de méis, utilizando representantes de méis claros e escuros, como o mel de trevo (*Trifolium* sp.) e o mel de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). Percebeu-se que o mel mais claro tinha dificuldade maior de fermentar e exigia mais aditivos de vitaminas, minerais e nitrogênio do que quando comparado com o mel escuro. Com a adição dos fatores de crescimento, todos os tipos de méis apresentavam teor alcoólico semelhante, fermentavam de forma rápida, mantinham seus sabores característicos, e sem certos sabores desagradáveis que podem vir de fermentações mais longas na ausência de fatores de crescimento (STEINKRAUS; MORSE, 1966).

CZABAJ *et al.* (2017) testaram o efeito do tratamento térmico do hidromel, no processo fermentativo e na atividade antioxidante, constatando que o tratamento térmico acelerou o processo de fermentação, teve efeitos significativos em suas propriedades antioxidantes, mas como desvantagem, houve a produção de HMF, o que pode afetar a qualidade do produto final. Entretanto, de modo geral, conclui-se

que um tratamento térmico cuidadosamente planejado pode melhorar a qualidade do produto, aumentando sua estabilidade de fermentação.

2.6. Compostos voláteis

Os compostos voláteis são moléculas orgânicas que apresentam baixo ponto de ebulição, o que faz com que sejam facilmente liberados na forma de vapores ou gases. Esses compostos podem ser encontrados em diferentes tipos de alimentos, incluindo bebidas alcoólicas obtidas a partir de processos fermentativos, a exemplo das cervejas, do hidromel e dos vinhos. A análise de compostos voláteis em bebidas alcoólicas tem como objetivo determinar as características químicas e sensoriais desses produtos, além de avaliar a autenticidade e qualidade dos mesmos. A presença de determinados compostos voláteis pode fornecer informações sobre o aroma e o sabor do produto, bem como sobre a presença de “defeitos” sensoriais (CASTRO-VÁZQUEZ; DÍAZ-MAROTO; PÉREZ-COELLO, 2006).

A identificação e quantificação de compostos voláteis presentes em amostras de hidromel podem ser realizadas através de técnicas analíticas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), além de outras metodologias disponíveis. Essas análises são importantes para avaliar a qualidade e estabilidade do produto final, permitindo a identificação de compostos específicos que podem afetar a sua composição e sabor (PASCUAL-MATE *et al.*, 2018).

Para a identificação inicial dos compostos, a CG-EM é comumente utilizada, comparando os espectros de massa dos compostos presentes na amostra com os espectros disponíveis nas bases de dados, como o NIST *Mass Spectral Data Base* e/ou biblioteca NIST. No entanto, há divergências sobre quais compostos podem atuar como marcadores odoríferos para um determinado tipo de mel, tendo em vista que diferentes variedades de plantas, origens geográficas e práticas apícolas podem influenciar na sua composição (MACHADO *et al.*, 2020).

Os compostos aromáticos voláteis desempenham um papel crucial na determinação da qualidade de bebidas alcoólicas, sendo responsáveis principalmente pela percepção do aroma característico de cada bebida. Em relação ao hidromel, o aroma resulta da contribuição do mel utilizado, da levedura empregada para a

inoculação e das condições de fermentação. A combinação dos diferentes compostos voláteis determina as características sensoriais específicas de cada produto (PEREIRA *et al.*, 2019).

A qualidade do hidromel é influenciada por diversos fatores, sendo a cepa de levedura utilizada um aspecto fundamental a ser considerado. A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente empregada na produção de cervejas e vinhos, tem sido comum na produção de hidromel. A obtenção de um rendimento efetivo de etanol está intimamente ligada à seleção cuidadosa da cepa de levedura, bem como às condições fermentativas empregadas, tais como a temperatura e a composição do mosto utilizado na produção. Além do etanol, em 2011, RAMALHOSA e colaboradores, relataram a habilidade das leveduras do gênero *Saccharomyces* em produzir pequenas quantidades de acetoína, ácido succínico, álcoois superiores, 2,3-butanodiol, diacetil, glicerol e vestígios dos ácidos acético e láctico, bem como em acetaldeído, os quais impactam diretamente na composição do aroma e sabor final do hidromel (RAMALHOSA *et al.*, 2011).

Alguns compostos, como o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), têm sido associados a diversas características de aroma em bebidas alcoólicas. Esse composto é comumente encontrado em produtos alimentícios e é considerado como resultado da degradação de Strecker ou associado a processos de oxidação lipídica. Estudos indicam que o 3-metil-1-butanol é um dos principais contribuintes e intensificador de sabor em vinhos, no entanto, ainda existem poucas correlações reais com atributos sensoriais mencionados na literatura (VILANOVA DE LA TORRE *et al.*, 2010).

Durante o processo de fermentação, algumas substâncias odoríferas, como o 2-feniletanol (álcool fenético), 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), podem ser produzidas. O aumento das concentrações de álcoois amílicos pode estar relacionado com as qualidades sensoriais das bebidas alcoólicas devido às suas notas características de odor alcoólico, fermentado e maltado. Os álcoois superiores são importantes componentes de sabor em bebidas alcoólicas, entretanto, níveis elevados desses compostos podem atuar como fatores negativos para o aroma da bebida, sendo considerados “defeitos” em alguns tipos de bebida, como lagers e vodka. Em contrapartida, níveis relativamente altos desses álcoois são considerados

componentes de sabor característicos em outras bebidas alcoólicas, como cervejas tradicionais, hidroméis e uísque (WELKE *et al.*, 2014).

2.7. Análises sensoriais

A análise sensorial dedica-se à analisar, interpretar e medir as respostas de avaliadores em relação às características sensoriais de produtos alimentícios. Essas características podem ser percebidas pelos sentidos humanos, tais como audição, olfato, paladar, tato e visão (DUTCOSKY, 2011).

Para atingir esses objetivos, existem diferentes métodos de análise sensorial, que podem ser classificados em três categorias principais: análise discriminativa, análise descritiva e análise afetiva. A análise discriminativa estabelece a diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre amostras, é utilizada para detectar alterações na qualidade ou na formulação do produto. Os métodos de análise descritiva são utilizados para quantificar e descrever características sensoriais de atributos específicos, devido à necessidade de precisão, os métodos discriminativos e descritivos devem ser realizados por pessoas treinadas e qualificadas. Já nos métodos de análise afetiva os consumidores avaliam os produtos alimentícios quanto a sua percepção pessoal, preferência e intenção de compra e não há necessidade de treinamento prévio para sua realização (LAWLESS *et al.*, 2010).

Os métodos de análise sensorial são utilizados para compreender e controlar a qualidade sensorial dos produtos alimentícios, atender às expectativas dos consumidores e desenvolver novos produtos. A análise sensorial afetiva, na qual os produtos são avaliados por um grupo de consumidores representativos do mercado-alvo do produto, é fundamental para compreender as preferências e o comportamento do consumidor e é comumente usado para informar o desenvolvimento de produtos e as decisões de marketing (MINIM *et al.*, 2010).

Dentre os métodos de análise afetiva podemos mencionar os testes de aceitação, de classificação e de atitude.

No teste de aceitação pode se mensurar a opinião dos consumidores que geralmente são solicitados a classificar os produtos em uma escala de "desgostei extremamente" a "gostei extremamente". Os resultados podem ser usados para identificar os produtos mais apreciados pelos consumidores. No teste de classificação

os consumidores são solicitados a comparar dois ou mais produtos e classificá-los em ordem de preferência. Esse tipo de teste pode ser útil para identificar o produto preferido entre um conjunto de opções. O teste de atitude mede a porcentagem de consumidores que estão dispostos a comprar ou consumir um produto. Os consumidores geralmente recebem uma escala de opções de compra, desde "com certeza compraria" a "com certeza não compraria". Os resultados podem ser usados para estimar o mercado potencial para um produto (MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 1999).

A questão do tamanho da amostra em análises sensoriais é amplamente discutida; GUAGLIANONI (2009) realizou um estudo com o objetivo de determinar o número mínimo de julgadores necessários para análises sensoriais de produtos alimentícios, através da comparação de procedimentos estatísticos paramétricos e não-paramétricos. Foram criadas 5400 amostras sistemáticas com diferentes números de julgadores, sobre as quais foram aplicados procedimentos estatísticos estabelecidos concluindo que o número mínimo de julgadores, considerado suficiente, é 60. Estes resultados são importantes para reduzir os custos e o tempo de realização de análises sensoriais, sem comprometer a precisão dos resultados.

Os testes devem ocorrer em um ambiente controlado que propicie as condições necessárias. É importante escolher um local adequado que seja de fácil acesso, isento de ruídos externos, com iluminação uniforme e temperatura agradável. Além disso, é necessário que o local contenha áreas específicas, como uma área de testes, preparação de amostras e uma sala de espera para os julgadores (CHAVES; SPROESSER, 2013).

Os resultados dos testes são analisados usando métodos estatísticos para identificar padrões nos dados e assim determinar a preferência geral, aceitação ou outras medidas de interesse. O cálculo da média fornece um resumo da preferência geral por cada produto ou atributo, enquanto a análise de variância (ANOVA) determina se há diferenças significativas nas classificações médias entre os produtos. Se a ANOVA mostrar diferenças significativas, testes *post-hoc*, como o teste de Tukey, podem ser usados para determinar quais produtos são significativamente diferentes uns dos outros. A análise de dados é uma etapa importante na interpretação dos resultados e na tomada de decisões sobre desenvolvimento e marketing de produtos. É importante usar métodos estatísticos apropriados e considerar cuidadosamente as limitações dos dados e o desenho do estudo (STONE; SIDEL, 2004).

3. Justificativa

Com base nas pesquisas anteriormente descritas, a padronização dos processos fermentativos e das leveduras utilizadas na produção do hidromel impactam significativamente na padronização do produto, uma vez que essas leveduras são capazes de conferir características sensoriais próprias à bebida. A caracterização do hidromel produzido em conformidade com a legislação em vigor pode ser útil para o estabelecimento de padrões prévios de qualidade e segurança para a produção e comercialização do produto. Além disso, a existência de um mercado consumidor receptivo ao produto hidromel representa uma alternativa promissora capaz de agregar valor ao mel brasileiro, bem como proporcionar aos apicultores uma fonte de renda adicional. No entanto, os desafios relacionados à legislação, padronização e popularização do produto precisam ser superados por meio de pesquisas que investiguem os processos fermentativos e as leveduras utilizadas na produção do hidromel.

4. Hipótese

É possível obter hidromel de alta qualidade dentro dos parâmetros vigentes de legislação, com características sensoriais atraentes para o mercado consumidor, por meio do uso de leveduras isoladas a partir do mel silvestre.

5. Objetivos

Avaliar a produção de hidromel a partir de leveduras isoladas de mel e resíduos de hidromel.

5.1. Objetivos específicos

- Isolar leveduras provenientes de resíduos de hidromel e mel;
- Identificar através de métodos moleculares as leveduras selecionadas;
- Produzir hidromel com as linhagens de leveduras selecionadas;
- Caracterizar o hidromel produzido físico-químico, organoléptica e quimicamente;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos hidroméis gerados;
- Avaliar a aceitação do mercado consumidor pelo produto hidromel.

6. Material e Métodos

6.1. Mel

O mel utilizado nessa pesquisa, classificado como mel silvestre, utilizado no isolamento de leveduras e na produção do hidromel foi cedido pelo apiário Fazenda Mussato CNPJ 64.699.267/0001-00, localizado em Monte Alto estado de São Paulo, SISP n° 0660/9975.

6.2. Resíduos de hidromel

Os resíduos de hidromel, também conhecidos como lama, são resultado da decantação de sólidos insolúveis e leveduras ao final do processo de fermentação. Os processos fermentativos ocorreram de forma artesanal por produtor independente no período de julho a dezembro de 2019, foram utilizadas leveduras comerciais da marca Lalvin® - EC 1118, variedade *Saccharomyces cerevisiae* (ex-bayanus).

6.3. Isolamento de leveduras

As leveduras foram isoladas a partir de amostras de resíduos de hidromel artesanal e mel silvestre *in natura*. Também foram utilizadas leveduras comerciais. A princípio os hidroméis artesanais utilizados foram produzidos utilizando-se leveduras comerciais EC 1118 da empresa Lalvin®, ao final o processo de clarificação os resíduos que decantam são classificados como lama, esta contém leveduras e sólidos insolúveis como resíduos de cera, proteínas e cinzas. Essas amostras de lama foram diluídas com água destilada e após diluição, 100 µL foram espalhados com ajuda de alça de Drigalski em placas de ágar Sabouraud (SAB) acrescido de cloranfenicol e estreptomicina ambos na concentração de 25 µg/mL.

Verificou-se o crescimento de colônias de leveduras nas amostras de resíduos de hidromel e na amostra de mel silvestre *in natura*, posteriormente as colônias foram isoladas através de método de estrias múltiplas utilizando se alça de platina, em meio SAB sólido.

6.4. Extração de DNA genômico

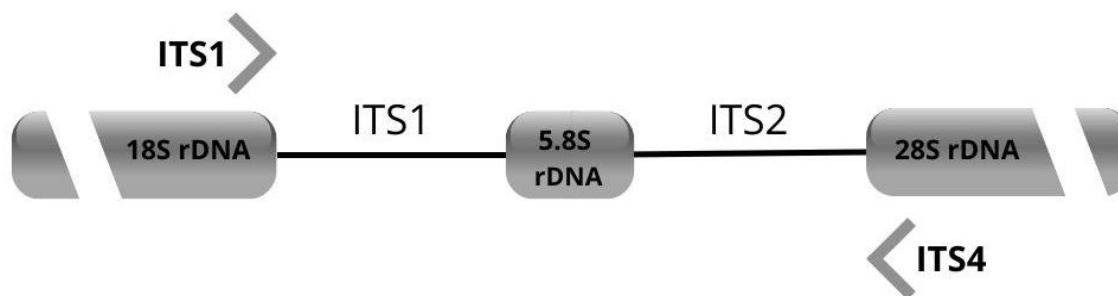
A partir do crescimento das colônias isoladas anteriormente foi realizada a extração de DNA genômico segundo protocolo rápido de isolamento de DNA de leveduras de acordo com GREEN e SAMBROOK (2012) com algumas modificações (Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL).

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio *Yeast Potato Dextrose* (YPD) líquido e mantidas a 30 °C em agitação *overnight*. Após crescimento os tubos foram centrifugados, o meio descartado e o *pellet* ressuscitado em 150 µL de tampão STES. Foi adicionado cerca de 0,1 g de *glass beads*, 60 µL de tampão de extração (TE) e 180 µL de fenol clorofórmio em cada amostra, seguido por processo agitação em vórtex por 1 minuto, com a finalidade de quebra da parede celular e exposição do material genético. Os tubos foram centrifugados na máxima rotação por 5 minutos em temperatura ambiente, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionado 400 µL de etanol 100 % gelado e 20 µL de acetato de sódio. Após incubação por 15 minutos em freezer -20 °C as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C em velocidade máxima, descartou se o sobrenadante e foi adicionado 100 µL de etanol 70 % que foi centrifugado na velocidade máxima por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Após secagem dos tubos o *pellet* foi ressuscitado em 40 µL de tampão de eluição (EB), posteriormente o DNA genômico total foi quantificado em NanoDrop (Implen NanoPhotometer® P-360) e a integridade do material genético verificada em gel de agarose 0,8 %.

6.5. Amplificação e análise da região ITS do DNA ribossomal

Para a amplificação da região ITS1 e ITS2 foram utilizados os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') Figura 2. Os *primers* foram escolhidos baseados em nucleotídeos conservados do gene 5.8S rDNA de *Saccharomyces*, como descrito por WHITE *et al.* (1990).

Figura 2 - Localização da região de rDNA entre os *primers* ITS1 e ITS4.



Fonte: Adaptado de WHITE *et al.* (1990).

As reações de amplificação da região 5.8S-ITS conduzidas em termociclador Bioer GenePro TC-E-96G, foram realizadas nos seguintes parâmetros de ciclo térmico: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos compostos por etapas de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão em 72 °C por 45 segundos; e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídio e submetidos à eletroforese com corrente constante de 100 V.

6.6. Purificação

Os fragmentos de DNA encontrados no gel de agarose resultante de PCR foram purificados por meio de kit GenElute (Gel Extraction Kit – Sigma). Os fragmentos de interesse foram extraídos do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina de bisturi e armazenados em microtubos que foram pesados. Adicionou-se 300 µL de *Gel Solubilization Solution* para cada 100 mg de gel de agarose, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 60 °C até total dissolução do gel. As colunas de ligação foram preparadas com 500 µL de *Column Preparation Solution* em cada coluna, posteriormente centrifugadas por 1 minuto e descartado o líquido. No tubo contendo o gel dissolvido foi adicionado isopropanol 100 % no mesmo volume que gel, as amostras foram colocadas nas colunas de ligação, e centrifugadas por 1 minuto descartado a fase líquida ao final. Foi adicionado 700 µL de *Wash Solution* nas colunas de ligação e centrifugado por 1 minutos duas vezes. As colunas foram transferidas para novos tubos e adicionado 50 µL de *Elution Solution*, seguiu-se incubação de 1 minuto e posterior centrifugação por 1 minuto, obtendo-se ao final uma solução líquida contendo os fragmentos de DNA.

6.7. Sequenciamento

As amostras líquidas contendo os fragmentos de DNA amplificados foram secas em estufa a 30 °C e enviadas para a empresa ACTGene que realizou o sequenciamento da região amplificada entre os *primers* ITS1 e ITS4 pelo método de Sanger.

6.8. Alinhamento

O alinhamento das sequências (*forward* e *reverse*) foram editadas no Chromas versão 2.6.6 (www.technelysium.com.au) e montadas no programa CLUSTALX versão 2.1 (www.clustal.org). As sequências foram alinhadas e comparadas com toda base de dados de sequências de DNA disponíveis através da Internet usando a Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A semelhança percentual entre os fragmentos foi calculada pelo BLAST®.

6.9. Curva de crescimento

A curva de crescimento das leveduras foi realizada em meio Sabouraud líquido e em mosto. O meio de cultura Sabouraud (Kasvi®) foi acrescido de clorfenicol (Sigma Aldrich®) e estreptomicina ambos na concentração de 25 µg/mL, enquanto o mosto foi preparado pela diluição de mel em água mineral na concentração de 30 °Brix e aquecido em banho à 60 °C por 20 minutos.

Foram selecionadas 3 cepas de leveduras: uma cepa isolada de lama de hidromel, outra isolada de mel silvestre e uma cepa comercial da empresa Mangrove Jacks® - M05 Mead a fim de comparação, todas foram previamente isoladas em placas de ágar Sabouraud e pré-inoculadas em meio líquido.

O meio de cultura e o mosto foram inoculados em duplicata na concentração inicial de 10⁶ células e mantidos em *shaker* a 30 °C e 200 rpm, amostras foram coletadas a cada hora no período de 12 horas, em cada amostra foi realizada a contagem celular e leitura de absorbância. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a absorbância medida em espectrofotômetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™) em comprimento de onda de 550 nm.

6.10. Preparação e fermentação do mosto

O pré-inóculo das cepas de leveduras selecionadas foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo meio Sabouraud com cloranfenicol e estreptomicina na concentração de 25 η g/mL, mantidos a 30 °C e 200 rpm por 24 horas. As leveduras foram ajustadas para concentração de 10^6 células, lavadas com solução salina, ressuspensas em mosto e então adicionadas ao volume total do mosto.

Foram preparados 9 litros de mosto a partir da diluição de mel silvestre em água mineral (1:2) obtendo-se 30 °Brix, esterilizado em banho-maria a 60 °C por 20 minutos em panela de alumínio e armazenado em 3 baldes fermentadores de polipropileno com volume total de 3 litros por balde.

A fermentação ocorreu a 30 °C em estufa, a evolução do °Brix foi observada semanalmente até sua estabilização em 17 °Brix, foi então realizada a primeira trasfega para frascos de vidro de 4 litros, que foram armazenados em geladeira a 4 °C por 20 dias para a ocorrência da clarificação.

Após a clarificação houve a segunda trasfega para garrafas de vidro verde previamente limpas e autoclavadas, as garrafas foram fechadas com tampa de metal, e então armazenadas por período de 60 dias em temperatura ambiente sem incidência de luz.

Foram realizadas três repetições do processo fermentativo, em cada fermentação o mosto foi inoculado, separadamente, com três diferentes cepas de leveduras sendo duas *Saccharomyces* (A31 e M05) e uma *Rhodotorula* (A51).

6.11. Parâmetros do Hidromel

6.11.1 Sólidos Solúveis (Brix)

Os sólidos solúveis (Brix) dos tratamentos foram avaliados diretamente com refratômetro manual da marca ATAGO modelo N-1E, devidamente calibrado segundo as instruções do fabricante.

6.11.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado pelo método potenciométrico utilizando um pHmêtro de bancada da marca MS Tecnopon modelo mPA210, previamente calibrado segundo as instruções do fabricante.

6.11.3 Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada em microplacas segundo metodologia estabelecida por SANTOS *et al.* (2017), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante.

As curvas analíticas foram aplicadas em microplacas de 96 poços de fundo chato com dez concentrações de glicose (2.0, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 g/L), em triplicata. Em cada poço das microplacas foram adicionados 25 µL de amostra (conforme a necessidade, diluídas com água destilada, de modo que sua leitura ficasse dentro da curva analítica) e 25 µL do reativo DNS (1 % ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30 % tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 mol/L de NaOH). Após pipetar amostras e reativo, as microplacas foram seladas com filme plástico e levadas a banho fervente por 5 minutos, resfriadas em gelo, então o filme plástico foi retirado e 330 µL de água foram adicionados. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™) em comprimento de onda de 492 nm. As concentrações, em g/L de glicose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva analítica, utilizando as medidas de absorbância em planilhas do Microsoft Excel®.

O cálculo da quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi realizado pela equação: $ART (g/L) = ((Absorbância\ 492\ nm + 0,141)/1,5229) * diluição\ amostra$, com o coeficiente de correlação (R^2), $R^2 = 0,9913$.

6.11.4 Teor Alcoólico

A princípio buscou-se aferir o grau alcoólico por meio de um alcoômetro, porém o valor encontrou-se abaixo da sensibilidade mínima do aparelho. Optou-se por estimar o álcool por volume (ABV) por meio de fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (produção de 51,11 g de etanol a cada 100 g de glicose consumida). Primeiramente obteve-se a estimativa em álcool por peso

(ABW) e então foi convertida em álcool por volume (ABV) através do cálculo da quantidade de álcool pelo peso estimado do etanol dividido pela densidade do etanol (0,789 g/cm³), obtendo se assim a estimativa do álcool por volume.

6.11.5 Extrato Seco

As amostras de hidromel foram pesadas e então submetidas à evaporação do álcool em temperatura ambiente por 3 dias, seguida de liofilização com o objetivo de extrair totalmente a água presente nas amostras, então foi novamente pesado e obtido o extrato seco (ES), de acordo com protocolo do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985) com adaptações.

6.11.6 Extrato Seco Reduzido

Para o cálculo do extrato seco reduzido (ESR) foi feita a subtração do valor de açúcares totais, quando este excede 1 g/L, do valor do extrato seco (ES), sendo assim: ESR = ATR (g/L) – ES (g/L) (RIZZON; MIELE, 1996).

6.11.7 Acidez Total

A acidez total foi determinada por meio da titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) padronizado a 0,1 N. Utilizou se 10 mL da amostra e 0,5 mL de fenolftaleína como indicador de pH (Adaptado IAL, 1985).

O cálculo da acidez total foi determinado pela equação:

$$\text{Acidez em mEq/L} = \frac{n \times N \times f \times 1000}{V}$$

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

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

V = volume tomado da amostra, em mL

6.11.8 Acidez Volátil

Para determinar a acidez volátil foram transferidos 10 mL da amostra para um balão de fundo redondo contendo 250 mL de água destilada e a solução foi destilada até obtenção mínima de 100 mL, o destilado foi recolhido em um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. Esta solução foi imediatamente titulada com Hidróxido de sódio 0,1N padronizada e fenolftaleína como indicador de cor, até a coloração rosea persistente por 30 segundos (adaptado de IAL, 1985).

O cálculo da acidez volátil foi determinado pela equação:

$$\text{Acidez em mEq/L} = \frac{n \times N \times f \times 1000}{V}$$

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

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

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V = volume da amostra, em mL

6.11.9 Acidez Fixa

A acidez fixa, expressa em mEq/L foi determinada pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil (FERRAZ, 2015).

6.11.10 Cinzas

O teor de cinzas do mosto e do hidromel foi realizada por incineração em mufla a 550 °C, segundo protocolo do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

6.12. Análise dos constituintes voláteis

A análise dos constituintes químicos voláteis foi realizada através da técnica de HS-SPME-GC-MS. Para a extração utilizou-se conjunto de SPME obtido da Supelco (Supelco park, Bellefonte, PA, EUA), com a exposição da fibra no *headspace* em 55 °C (10 min.) e tempo de dessorção de 5 minutos. Para a análise cromatográfica,

utilizou-se equipamento Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: Coluna capilar: CP WAX 52CB (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); Temperatura do injetor: 200 °C; Temperatura do detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,2 mL/min; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 40 °C (2 minutos); 40 °C – 230 °C, 3 °C/minuto, com tempo total de corrida de 67 minutos. A análise foi realizada em modo *Scan*, com intervalo de *m/z* entre 40-250 Da.

6.13. Análise sensorial

Para avaliar as características sensoriais dos hidroméis produzidos, foram realizados os testes afetivos de aceitação, atitude e de preferência por ordenação. Os testes sensoriais foram realizados conforme metodologia descrita por CHAVES e SPROESSER (2013).

A avaliação sensorial do hidromel produzido foi realizada mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (Processo CAAE nº 63102222.6.0000.5498).

Foram recrutados 100 avaliadores não treinados do sexo masculino e feminino, comprovadamente maiores de 18 anos, não gestantes e que não possuem qualquer restrição/alergia a bebidas alcoólicas e derivados de mel. Estes avaliadores foram convidados voluntariamente a participarem da análise sensorial e a eles foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2), informando-lhes sobre os objetivos do projeto e orientando sua participação na análise. A análise sensorial foi realizada no Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP.

Os avaliadores aguardaram em local separado e foram convidados a adentrar a sala em grupos de três pessoas por vez, foram também orientados a se sentarem em locais distantes e demarcados dentro de uma sala climatizada. As amostras codificadas com algarismos de três dígitos foram servidas em copos plásticos e transparentes contendo aproximadamente 20 mL de hidromel, na temperatura aproximada de 5 °C. Foram oferecidas água e bolacha *cream cracker*® a fim de realizar a limpeza do palato entre as amostras, também foi oferecida uma amostra de

café em grãos para neutralizar o aroma entre as amostras. As amostras de hidromel fornecidas foram identificadas como 310 que representa o hidromel fermentado pela levedura A31, assim como, a amostra 510 para levedura A51 e 050 para levedura M05.

Foi aplicada a ficha de análise sensorial (Anexo 3), avaliando a aceitação, intenção de compra do produto e ordenação das amostras.

Para avaliação de aceitação cada amostra foi julgada frente aos atributos aparência, aroma, sabor, teor alcoólico e impressão geral. Foi utilizada a escala hedônica verbal de 9 pontos de PERYAM e GIRARDOT, 1952, a forma geral da escala é apresentada como: 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.

Para a avaliação de intenção de compra do produto hidromel foi utilizada a escala de cinco pontos descrita por CHAVES e SPROESSER, 2013, a forma geral da escala é apresentada como: 1 – Certamente não compraria; 2 – Possivelmente não compraria; 3 – Talvez comprasse / talvez não comprasse; 4 – Possivelmente compraria; 5 – Certamente compraria.

Para o teste de ordenação foi orientado aos participantes ranquear as amostras em primeiro (1) segundo (2) e terceiro (3) lugar, sendo número 1 para amostra que mais gostou e número 3 para que menos gostou.

Os resultados gerados foram compilados e submetidos à análise estatísticas. Os dados coletados, pelo teste de aceitação foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), utilizando como fontes de variação as amostras e os julgadores, as análises foram realizadas através de ferramentas de análises de dados pelo software Microsoft Office Excel[®]. As médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância (DUTCOSKY, 2011; LUCAS; DALLA NORA, 2021).

Os dados do teste de intenção de compra foram avaliados pela frequência através dos gráficos de histograma e o cálculo do intervalo de confiança (IC) foi aplicado por meio da equação a seguir, $IC_{\alpha,0,95} = \hat{p} - E < p < \hat{p} + E$ (TRIOLA, 2018).

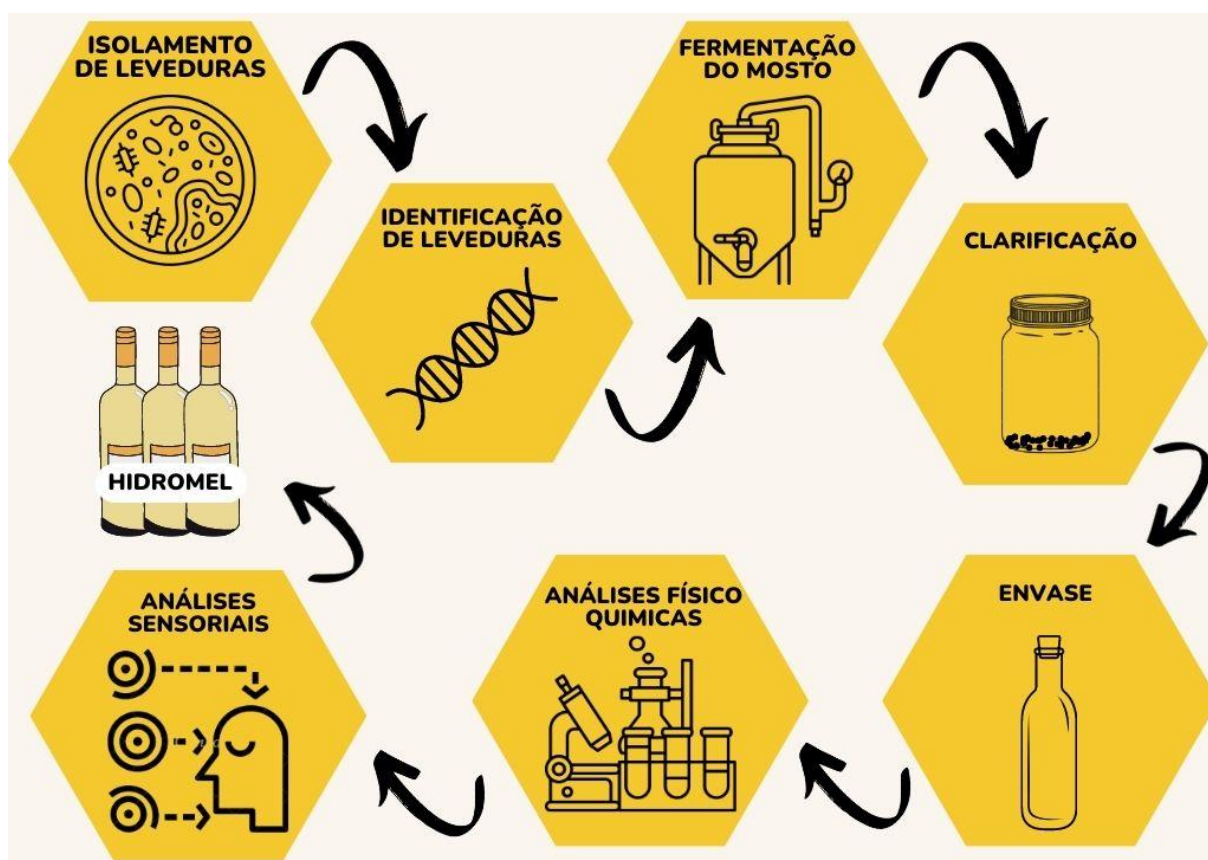
Os resultados do teste afetivo de preferência por ordenação foram analisados por meio de estatística não-paramétrica, utilizando o teste de Friedman, conforme indicado por DUTCOSKY (2011).

7. Resultados e Discussão

7.1. Fluxograma de execução do processo

Foi elaborado um fluxograma das atividades realizadas, nessa sessão, as quais foram executadas conforme Figura 3, apresentada a seguir:

Figura 3 - Fluxograma das atividades realizadas.



7.2. Seleção e identificação de leveduras

O isolamento de leveduras se deu a partir de mel *in natura* e de resíduos de hidromel provenientes de produção artesanal. Dentre as leveduras isoladas da lama de hidromel temos as amostras A21, A22, A31 e A32, enquanto a amostra A51 foi isolada de mel *in natura* e as amostras C1 e C2 são leveduras comerciais, sendo C1 fermento culinário da marca Fleischmann® e C2 leveduras comerciais para produção de hidromel M05 da empresa Jack Magroves®.

Na Tabela 5 está descrita a procedência de cada amostra e aspectos morfológicos das colônias.

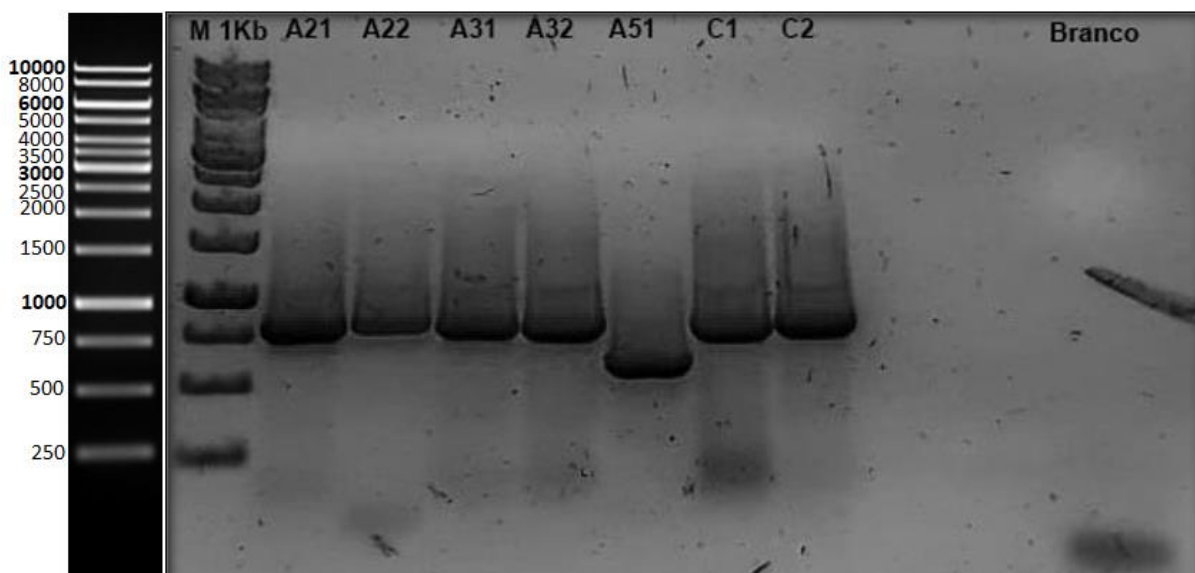
Tabela 5 - Descritivo morfológico do isolamento de amostras de leveduras.

Isolado	Descrição	Aspecto colônia
A21	Resíduo da produção de hidromel A2	Branca, brilhante, lisa
A22	Resíduo da produção de hidromel A2	Branca, brilhante, lisa
A31	Resíduo da produção de hidromel A3	Branca, brilhante, lisa
A32	Resíduo da produção de hidromel A3	Branca, brilhante, lisa
A51	Mel Silvestre – Fazenda Mussato	Rósea, brilhante, lisa
C1	Levedura comercial culinária	Branca, opaca, lisa
C2	Levedura comercial para hidromel	Branca, brilhante, lisa

Fonte: elaboração própria (2023).

Observou-se semelhança morfológica nas colônias provenientes de resíduos de hidromel e *Saccharomyces* comerciais, enquanto as colônias provenientes do mel *in natura* apresentaram a coloração rósea sugestiva para o gênero *Rhodotorula* sp.

Figura 4 - Fragmentos de amplificação da região ITS e padrão do marcador utilizado.



Legenda: M 1Kb – Marcador molecular 1kb GeneRuler, DNA Ladder, A21 – Amostra A21, A22 – Amostra A22, A31 – Amostra A31, A32 – Amostra A32, A51 – Amostra A51, C1 – Amostra C1, C2 – Amostra M05, Branco – Controle Branco. * Gel de agarose 1 % em TAE.

O material genético das amostras apresentadas na Tabela 5 foi extraído, separadamente. A região ITS foi amplificada e os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose como demonstrado na Figura 4. Nesta figura, pode-se observar a amplificação da região ITS de todas as amostras. Seis delas (A21, A22, A31, A32, C1 e C2) exibem tamanho de banda compatível com o tamanho esperado para *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a amostra A51 apresenta um fragmento de banda de menor peso molecular, evidenciando tratar-se de outro gênero de levedura.

Os genes que formam as subunidades 18S, 5.8S e 26S dos ribossomos estão separados por duas regiões espaçadoras, que são transcritas junto com o gene, porém não incorporadas ao transcrito maduro, essas regiões são conhecidas como espaçadores de transcrito interno - ITS, as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico (rDNA) de leveduras são utilizadas para identificação confiável das espécies. WHITE *et al.* (1990) utilizaram a região ITS do DNA ribossômico que, uma vez selecionada através dos *primers* ITS1 e ITS4, amplificam a unidade repetitiva do rDNA que inclui o gene do rRNA 5.8S, assim como suas regiões não-codificante designadas como ITS1 e ITS2. Resultados prévios demonstraram que as regiões ITS (não-codificantes e variáveis) e o gene do rRNA 5.8S (codificante e conservada) são úteis para a classificação das espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces* (VALENTE *et al.*, 1996; ARLORIO; COÏSSON; MARTELLI, 1999; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

Através de técnicas moleculares e sequenciamento, LAS HERAS-VAZQUEZ *et al.* (2003) identificaram leveduras (*Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus* e *Trichosporon asahii*) presentes na fermentação espontânea do suco de laranja, usando PCR-RFLP na região ITS1-5.8S-ITS2 e sequenciamento da região ITS. Os produtos da PCR do estudo citado identificaram fragmentos em cerca de 600 pb e 880 pb, identificando as espécies de levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente (LAS HERAS-VAZQUEZ *et al.*, 2003).

Os fragmentos, de DNA, observados na Figura 4 apresentam cerca de 550 pb para a levedura A51 e 750 pb para as amostras A21, A22, A31, A32, C1 e C2, respectivamente. Produtos da PCR de espécies do mesmo gênero apresentaram tamanhos moleculares idênticos ou muito semelhantes, apesar disso, para assegurar

identificação optou-se por fazer o sequenciamento desses fragmentos a fim de constatar diferenças entre espécies.

Por apresentar semelhanças morfológicas entre as colônias e o tamanho de fragmento, a amostra A31 foi sequenciada e a A32 excluída do sequenciamento. Por ser uma levedura padronizada e comercial, a amostra C1 proveniente de fermento biológico Fleischmann[®], foi utilizada no intuito de controle para o tamanho do fragmento para *Saccharomyces cerevisiae* nas análises moleculares.

O material genético proveniente do gel de agarose (Figura 4) foi extraído, purificado e sequenciado. As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa Chromas, com a finalidade de garantir melhor qualidade e precisão da análise do fragmento. Os arquivos gerados foram comparados com sequências depositadas no GenBank, os resultados de maiores similaridades e menos *gaps* para região ITS1; 5.8S e ITS2 encontram-se descritos no Anexo 1 (Tabela 8).

Estudos adotam divergências significativas de 3 % em relação a sequências depositada no GenBank como margem aceitável para divergências entre cepas na região ITS dos fungos (NILSSON *et al.*, 2008). No entanto podemos aceitar menores similaridades quando buscamos uma identificação entre espécies, as amostras A21, A22, A31, M05 obtiveram similaridades da região ITS acima de 85 % para gênero *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a amostra A51 obteve 100 % para gênero *Rhodotorula mucilaginosa*. A partir dos resultados preliminares foram selecionadas 3 amostras, sendo duas pertencentes ao gênero *Saccharomyces*: amostra A31 isolada de resíduos de hidromel e amostra M05 proveniente de cepa comercial selecionada para hidromel, e uma amostra do gênero *Rhodotorula* (A51).

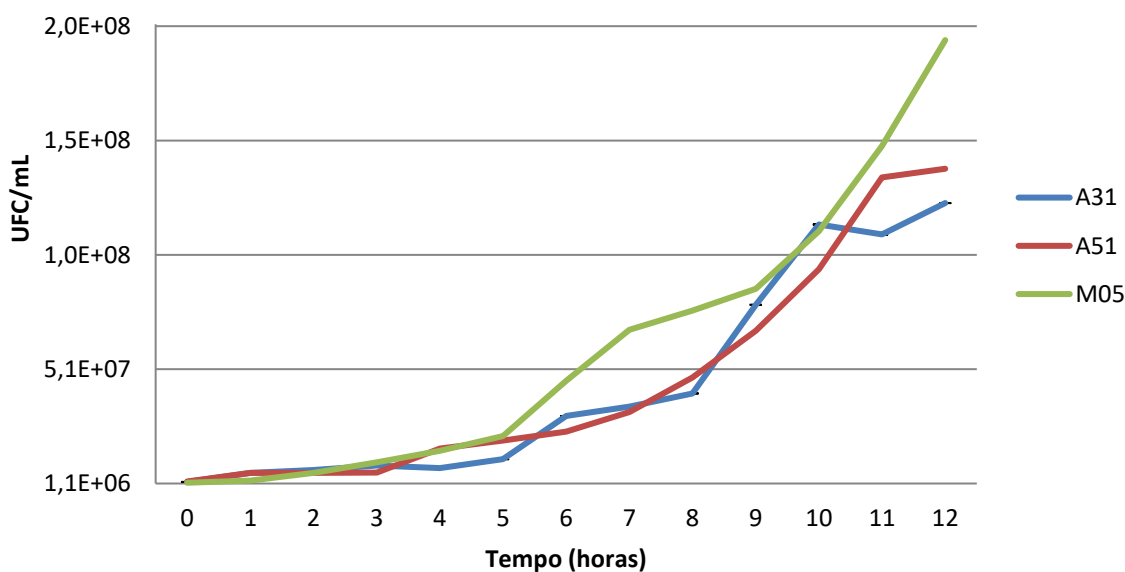
7.3. Curva de Crescimento

A deficiência de nutrientes durante a fermentação alcoólica tem se mostrado um dos principais desafios para produção de fermentados como hidromel, vinhos e cervejas. O mosto de mel e água pode apresentar-se como ambiente hostil para o crescimento de leveduras uma vez que a composição do mel é composta predominantemente de açúcares, além da concentração de nitrogênio deficitária assim como outros compostos necessários para síntese de membrana celular. Limitações de nutrientes, principalmente nitrogênio são amplamente estudadas em fermentações alcoólicas, pois a fase exponencial do crescimento da levedura requer

mais nitrogênio do que fases posteriores (JACKSON, 2008, SILVA, 2016; TWILLEY; JUTZI; TOMASINO, 2018; RIBEIRO; OLIVO; ELLER, 2020; CUENCA *et al.*, 2021).

Com o propósito de investigar a capacidade das leveduras selecionadas crescerem em mosto não suplementado, além de obter um comparativo com meio de cultura padrão, as leveduras selecionadas foram inoculadas na concentração inicial de 1×10^6 UFC/mL em meio de cultura Sabouraud específico para leveduras (SAB) e em mosto de mel silvestre; alíquotas foram extraídas a cada uma hora pelo período de 12 horas. Cada alíquota foi submetida à leitura de absorbância e contagem de células viáveis, as curvas de crescimento dos diferentes meios podem ser observadas nos Gráficos 1 e 2.

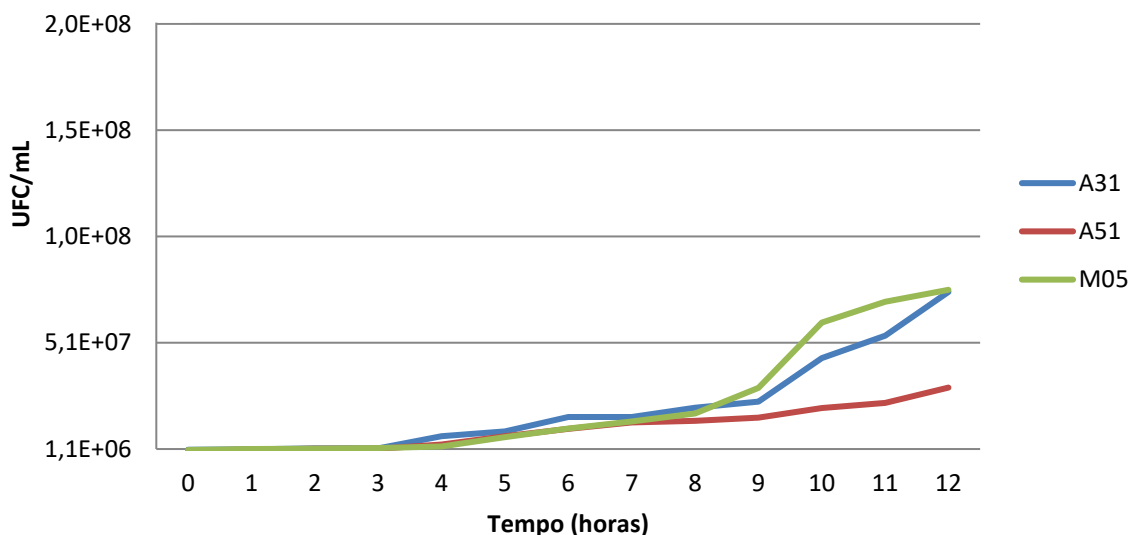
Gráfico 1 - Crescimento em meio de cultura Sabouraud.



Fonte: elaboração própria (2023).

Legenda: A31 - *Saccharomyces cerevisiae* isolada de resíduos de hidromel, A51 - *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de mel silvestre, M05 - *Saccharomyces* spp. cepa comercial específica para hidromel.

Gráfico 2 - Crescimento celular em mosto de mel e água (1:2).



Fonte: elaboração própria (2023).

Legenda: A31 - *Saccharomyces cerevisiae* isolada de resíduos de hidromel, A51 - *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de mel silvestre, M05 - *Saccharomyces* spp. cepa comercial específica para hidromel.

A fase de latência (*lag*) é compreendida pelo intervalo de adaptação da levedura ao meio, onde nota-se o crescimento mais lento, após a adaptação ao meio inicia-se a fase exponencial (*log*) onde o crescimento atinge sua velocidade máxima até que as células estacionam seu crescimento, na fase de declínio o meio se torna hostil devido a presença de substâncias tóxicas às células (WANG *et al.*, 2004). Observa-se que, embora a quantificação por ambos métodos (colorimétrico e contagem) apresente perfis semelhantes, o crescimento em mosto se apresenta mais lento sugerindo maior dificuldade da assimilação dos nutrientes disponíveis.

A levedura M05 proveniente de cepa comercial específica (*Saccharomyces* spp.) para produção de hidromel apresenta multiplicação superior quando comparada com demais amostras em ambos cenários, enquanto a levedura A51 isolada de mel (*Rhodothorula mucilaginosa*) obtém o menor desempenho de crescimento. Os resultados apontam que em 12 horas de fermentação em mosto as leveduras tiveram um crescimento de $8,0 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto no meio de cultura (Sabouraud) essa mesma quantidade celular pode ser observada entre o 8 e 9 horas de incubação.

Independente da taxa de multiplicação celular diferencial, observa-se que as leveduras foram capazes de multiplicarem-se no mosto sem necessidade de suplementação nutricional.

É importante observar que as condições de cultivo que proporcionem o máximo de crescimento celular podem não ser necessariamente aquelas que proporcionem vantagens ao processo de fermentação. Entende-se que a célula das leveduras possui compartimentações para adequação da atividade metabólica, logo o processo de glicólise anaeróbica responsável pela fermentação alcoólica ocorre no citoplasma, enquanto que respiração por via da oxidação total do açúcar se dá na mitocôndria (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; DELLA-BIANCA *et al.*, 2013). Conseqüentemente a necessidade de submeter as leveduras a ambientes estritamente anaeróbicos se faz essencial para a produção de etanol, portanto essas leveduras seguiram para ensaios de fermentações em escala piloto.

7.4. Processo fermentativo

As leveduras utilizadas na produção de hidromel são geralmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, muitas vezes provenientes de leveduras selecionadas para produção de vinho, cerveja e champanhe. No entanto, o mosto do hidromel se difere em relação ao teor de açúcar e concentrações de nitrogênio. Assim, as cepas de levedura utilizadas para outros fermentados não são necessariamente adequadas para a produção de hidromel (RAMALHOSA *et al.*, 2011).

Além da escolha da levedura, a elaboração do mosto pode influenciar nas características finais do produto, devendo atentar-se aos parâmetros pH, concentração de açúcares e minerais, além das características particulares de cada mel (GUPTA; SHARMA, 2009; GOMES *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). Os méis escuros detêm maior teor mineral e altas concentrações de açúcares fermentáveis, que podem favorecer na fermentação alcoólica (SILVA, 2016; BERGAMO *et al.*, 2019).

Com o objetivo de evitar contaminação por outros microrganismos a preparação do mosto utilizou água mineral comercial aquecida, onde foi diluído o mel e mantido a 60 °C por 30 minutos em banho (MATTIETTO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2009). A concentração de sólidos solúveis no mosto foi ajustada para 30 °Brix na

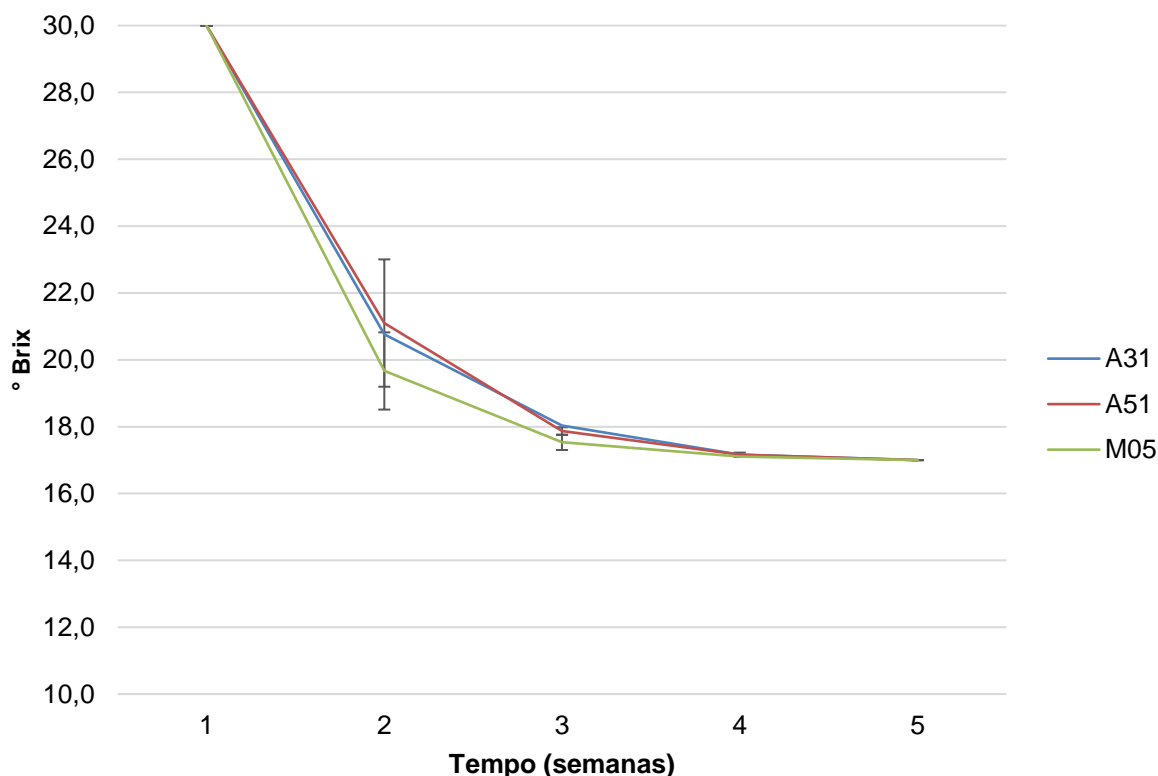
busca de um hidromel suave. Na literatura podemos observar que esse parâmetro varia entre 20 a 30 °Brix e exerce influência direta no dulçor do produto final, sendo que mostos com mais açúcares resultam em hidroméis mais suaves (GOMES *et al.*, 2015; GUPTA; SHARMA, 2009; MATTIETTO *et al.*, 2006).

O pH do mosto é sobretudo influenciado pelo pH do mel, uma vez que seu valor de pH se encontra entre 2,93 e 4,12 (IGLESIAS *et al.*, 2012; COSTA SANTOS; DE OLIVEIRA, 2013). Estudos sugerem que o pH do mosto deve estar no máximo em 4,5, evitando que durante a fermentação ocorra a formação de álcoois superiores em excesso, bem como prevenindo o aparecimento de bactérias contaminantes (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010). Nesse estudo o pH do mosto se manteve dentro da faixa 4,5 a 4,1, corroborando com os valores sugeridos por GUPTA e SHARMA (2009).

Diferentes autores investigaram a influência da temperatura no processo fermentativo, embora não haja um consenso, para que haja uma melhor eficiência da fermentação, a temperatura recomendada encontra-se entre 18 e 30 °C (GUPTA; SHARMA, 2009; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2017). IGLESIAS *et al.* (2014) pontuaram que leveduras *S. cerevisiae* apresentam maiores taxas de fermentação em temperaturas entre 20 e 30 °C, enquanto temperaturas inferiores a 15 °C e acima de 30 °C estão associadas a diminuições no desempenho fermentativo e consequentemente o aumento do período de fermentação.

A fermentação foi conduzida com os recipientes mantidos em estufas com temperaturas monitoradas de 30 °C, acompanhada semanalmente até a estabilização do consumo de sólidos solúveis que se deu a 17 °Brix na quarta semana de fermentação, a variação do °Brix no período pode ser visualizada no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Variação °Brix durante a fermentação.



Fonte: elaboração própria (2023).

Legenda: A31 - *Saccharomyces cerevisiae* isolada de resíduos de hidromel, A51 - *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de mel silvestre, M05 - *Saccharomyces* spp. cepa comercial específica para hidromel.

Durante a primeira semana observa-se maior variação do °Brix como indicativo de uma maior atividade fermentativa no período. A partir do consumo dos nutrientes disponíveis a variação diminui até sua estabilidade que ocorre após a terceira semana, o que sugere o final da atividade fermentativa das amostras. As cepas analisadas demonstram comportamento semelhante entre si, sinalizando que todas as cepas estudadas apresentam capacidade de assimilar os sólidos solúveis presentes do mosto.

Os sólidos solúveis configuram em sua maior parte açúcares que são consumidos pelas leveduras e resultam no aumento da concentração de etanol, que por sua vez, inibem as células e levam a morte celular, com isso há a sedimentação de células no fermentador (MORAIS *et al.*, 1997; BADOTTI, 2005).

Ao final da fermentação o líquido é separado do sedimento e o hidromel passa por um período de maturação que inclui a clarificação, processo necessário para que

haja a total decantação das leveduras e a sedimentação das partículas em suspensão (IGLESIAS *et al.*, 2014). Embora o processo de clarificação seja realizado em grande parte por aditivos como bentonita e gelatina (PEREIRA *et al.*, 2009; VENTURINI FILHO, 2021) optou-se, no presente trabalho, pela clarificação a frio.

Embora as leveduras não-*Saccharomyces* sejam reconhecidas na literatura como produtoras de compostos voláteis frutados capazes de melhorar o perfil sensorial de bebidas fermentadas, essas leveduras apresentam baixa ação fermentativa podendo dominar o meio por alguns dias antes de diminuírem sua população por mortalidade, e são, suplantadas por leveduras com maior poder fermentativo, em sua maioria *S. cerevisiae* presentes na microbiota da matéria-prima (MICHEL; BIZEAU; DRILLEAU, 1990; LILLY; LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Estudos que avaliaram processos fermentativos de etanol em usina evidenciam o desaparecimento das cepas primárias e substituições por cepas mais competitivas que as das leveduras da microbiota primária. DA CRUZ *et al.* (2017) observaram o aparecimento de leveduras com perfil genético de leveduras nativas enquanto as cepas inicialmente inoculadas no mosto diminuíram sua contribuição na população em aproximadamente 35 %, chegando a quase desaparecer no final da safra. REIS *et al.* 2016 também observaram a substituição da população de leveduras no processo fermentativo ao monitorarem a safra de uma usina sucroalcooleira através de cariotipagem.

7.5. Caracterização físico-química do Hidromel

A caracterização físico-química de bebidas fermentadas é fundamental para a determinação de sua identidade e qualidade, sendo os principais parâmetros a densidade, o teor alcoólico, a acidez total e volátil e os açúcares redutores (MILESKI, 2016). Os resultados obtidos na caracterização físico-química e o padrão permitido pela legislação vigente são apresentados na Tabela 6.

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

Parâmetros	Padrão Referência	Amostra A31	Amostra A51	Amostra M05
pH	Não determinado	4,22 ± 0,02	4,20 ± 0,02	4,19 ± 0,02
Sólidos solúveis °Brix	Não determinado	17 °Brix	17 °Brix	17 °Brix
Acidez fixa	Mínimo 30 mEq/L	67,5 ± 1,5 mEq/L	72 ± 1,9 mEq/L	72,5 ± 2,0 mEq/L
Acidez total	50 – 130 mEq/L	70 ± 1,3 mEq/L	78 ± 1,5 mEq/L	76 ± 1,8 mEq/L
Acidez volátil	Máximo 20 mEq/L	2,5 ± 0,2 mEq/L	6 ± 0,4 mEq/L	3,5 ± 0,2 mEq/L
Teor de açúcar em g/L	Abaixo de 3 g/L (Seco) Acima de 3 g/L (Suave)	6,58 ± 0,06 g/L	6,56 ± 0,04 g/L	6,60 ± 0,04 g/L
Gradação alcoólica, em % v/v a 20 °C.	4 – 14 %	8,41 %	8,41 %	8,41 %
Extrato seco reduzido, em g/L	Limite mínimo 7 g/L	96,78 ± 0,38 g/L	97,05 ± 0,43 g/L	98,13 ± 0,65 g/L
Cinzas, em g/L	Limite mínimo 1,5 g/L	4,9 ± 0,01 g/L	4,3 ± 0,06 g/L	5,0 ± 0,01 g/L

Fonte: Autora e BRASIL, 2012. Os resultados são as médias de três repetições.

Os valores de pH variaram entre 4,22 e 4,15 o que possibilita maior resistência a possíveis contaminações microbiológicas. PEREIRA (2008) apresentou valores de pH para hidromel na faixa de 3,8 a 4,9. Apesar das diferenças observadas, não foi possível comparar com as normas, visto a inexistência de referência legislada como padrão para este parâmetro.

A acidez quando acima dos parâmetros estabelecidos pode estar relacionada com contaminação por bactérias acidogênicas ou eventual oxidação provocada pelo oxigênio (PEREIRA *et al.*, 2009).

A acidez total das diferentes amostras de hidromel variou entre 70 mEq/L e 78 mEq/L, sendo o menor valor de acidez total foi identificado na amostra A31 enquanto o maior valor, foi observado na amostra A51. Os resultados obtidos por MILESKI (2016) encontrou acidez total entre 53,66 a 66,66 mEq/L e este mesmo autor, concluiu que houve uma condução adequada dos processos fermentativos das suas amostras.

O limite de acidez volátil recomendado para hidroméis é de 20 mEq/L segundo o recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2012), entretanto pesquisas exibem valores de até 102,6 mEq/L (MENDES-FERREIRA *et al.*, 2010). PEREIRA *et al.* (2009) afirma que, altos níveis de acidez volátil estão relacionados a 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 indesejáveis. Nas análises conduzidas durante a realização deste trabalho, o hidromel, proveniente de todas as leveduras avaliadas, apresentaram valores de acidez volátil abaixo do limite máximo permitido pela legislação vigente (Tabela 6), o que demonstra que os processos de clarificação e trasfega foram altamente eficientes na “remoção” de qualquer microrganismo oportunista que por ventura pudesse ter resistido ao processo de esterilização do mosto.

A acidez fixa é determinada pela diferença entre a acidez total e a acidez volátil, os valores encontrados estão entre 72,5 e 67,5 mEq/L e estão de acordo com a legislação vigente que indica um mínimo 30 mEq/L.

É importante relatar que essas medidas de acidez tendem a mudar com o tempo. Por este motivo é indicado aguardar, no mínimo seis meses, o tempo de maturação do hidromel produzido.

A determinação dos sólidos solúveis é muito utilizada nas produções alcoólicas, sua apresentação na forma de escala °Brix indica quantos gramas de sólidos solúveis há em 100 gramas de solução aquosa, embora grande parte dos sólidos seja composta por açúcares fermentáveis, pode conter outras substâncias dissolvidas como taninos, pigmentos de cor derivados do mel, ácidos e minerais (RAMALHOSA *et al.*, 2011). Mesmo sendo um valor estimado da quantidade de açúcar fermentável a inclusão como parâmetro pode ser uma opção viável, uma vez que são necessárias pequenas amostras e sua aferição é simples, também pode ser útil na estimativa da obtenção final de etanol.

Para a estimativa do percentual de álcool foram feitos cálculos indiretos, com o uso do refratômetro. Foi acompanhada a variação do °Brix durante a fermentação, o mosto iniciou em 30 °Brix e finalizou em 17 °Brix, como cada °Brix representa aproximadamente 1 grama de açúcar total por 100 gramas de solução. Podemos calcular a quantidade de açúcar consumida durante a fermentação através dessa variação: $(30^{\circ}Bx - 17^{\circ}Bx) = 13^{\circ}Bx$, assim, obtemos a quantidade de açúcar fermentável de aproximadamente 130 g por 1000 g de solução.

Os principais produtos obtidos da fermentação por leveduras, são o etanol e o dióxido de carbono, esse mecanismo foi estudado pela primeira vez por Gay-Lussac, em que 100 g de glicose rendem 51,1 g de etanol e 48,9 g de dióxido de carbono, isso representa um rendimento teórico de 51,1 % em massa, sendo reconhecido como

coeficiente de Gay-Lussac (WALKER; WALKER, 2018). Sendo assim, 130 g de açúcar fermentável podem render 66,43 g de etanol, considerando o peso de 1000 g/L essa quantidade de etanol representa 6,64 % do peso total. Porém no Brasil utilizamos a representação Álcool por volume (ABV), portanto podemos calcular o volume da quantidade de álcool pelo peso estimado do etanol dividido pela densidade do etanol (0,789 g/cm³), logo: $66,43\text{g} / 0,789\text{ g/cm}^3 = 84,15\text{ cm}^3$, ou seja 84,15 mL de etanol em 1 litro, ou ainda 8,41 % de etanol no volume total.

Há de se ressaltar que a literatura contempla várias formulas para estimar a porcentagem de álcool produzido pelo processo de fermentação em cervejas e vinhos. HALL (1995) apresentou um artigo sobre o cálculo de álcool por peso e por volume em cervejas, onde se utilizou de dados de densidade inicial e final do processo, sendo: Álcool por peso (ABW) = $76.08 * (\text{densidade inicial} - \text{densidade final}) / (1.775 - \text{densidade final})$ e Álcool por volume (ABV) = $ABW * (\text{densidade final} / 0.794)$. Enquanto MARGALIT (2012) estimou ABV em vinhos e propôs estimar pela fórmula $ABV = (^\circ\text{Brix} * 0,57 \pm 0,03)$, sugerindo assim um intervalo que contempla as variações da matéria-prima. Na área de produção de hidromel a fórmula mais utilizada foi descrita por PIATZ (2014), que estima ABV como a $\text{Gravidade Original} - \text{Gravidade Final} * 131$, por mais que as fórmulas sejam próximas do resultado correto, sabemos que a relação entre densidade e sua conversão para o álcool não é perfeitamente linear, portanto um coeficiente com certa variação poderia ser uma alternativa mais real.

Embora haja limitações na estimativa ABV, os hidroméis produzidos contêm cerca de 8,41 % ABV estando assim dentro dos parâmetros permitidos por legislação (4 a 14 %) (BRASIL, 2012). GOMES *et al.* (2015) também utilizaram mosto a 30 °Brix inicial, e observaram que leveduras comerciais foram capazes de produzir 5,9 % (v/v) de etanol. GUPTA e SHARMA (2009) também relataram valores de 4,6 e 11,8 % (v/v) de etanol em hidroméis com 13 e 8,2 °Brix finais respectivamente.

Inicialmente o mosto apresentava 22,77 g/L de ART enquanto o hidromel produzido apresentou uma variação de ART residuais de 6,56 a 6,60 g/L, esses açúcares presentes ao final da fermentação são responsáveis pelo dulçor final da bebida. Segundo GOMES *et al.* (2015), embora hidroméis mais doces sejam melhores aceitos pelos consumidores, deve-se atentar que a concentração elevada de açúcares residuais pode permitir a refermentação do hidromel, além de promover um aumento da acidez prejudicando as características sensoriais do produto final (GOMES *et al.*,

2015). Vale salientar que os autores descartaram um hidromel cuja concentração de açúcares residuais foi de 32,7 g/L, valor maior que os encontrados no presente trabalho.

A presença de ART residuais no produto final indica o efeito inibitório da concentração de etanol produzido na fermentação, além de indicar quanto do açúcar não metabolizado (SROKA; TUSZYŃSKI, 2007).

Segundo a legislação brasileira para hidromel (BRASIL, 2012), pode se classificar o hidromel em suave, quando apresentam teor de açúcares acima de 3 g/L, e secos quando inferior. Sendo assim, os hidroméis produzidos no estudo são classificados como suave.

O extrato seco (ES) é um parâmetro que está relacionado com a estrutura e o corpo de bebidas alcoólicas, em vinhos podemos classificar aqueles com menos de 20 g/L de extrato são considerados leves e, acima de 25 g/L, encorpados (RIZZON; MIELE, 1996, HASHIZUME *et al.*, 2001). O ES é constituído por ácidos, sais, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, açúcares e polissacarídeos. Através do ES podemos calcular o teor de extrato seco reduzido (ESR) pela subtração do valor de açúcares totais, quando este excede 1 g/L, do valor do extrato seco total (RIZZON; MIELE, 1996). A legislação brasileira para hidromel impõe que os hidroméis devam apresentar uma concentração de ESR no mínimo de 7 g/L, sendo assim, o presente estudo se encontra dentro dos parâmetros por apresentar ESR acima de 96,78 g/L (BRASIL, 2012).

O parâmetro de cinzas expressa o teor de resíduos minerais fixos, em sua maioria minerais derivados da matéria-prima do mel como o potássio, cálcio, magnésio, sódio, enxofre, fósforo entre outros. Estudos indicam que os méis escuros apresentam maior conteúdo de cinzas quando comparados com méis claros (LASCEVE; GONNET, 1974; BOGDANOV, 2008). Os resultados do presente estudo demonstraram valores de cinzas de 4,3 a 5,0 g/L estando de acordo com os parâmetros de identidade e qualidade do hidromel segundo legislação (BRASIL, 2012).

Embora as amostras de hidroméis produzidos estejam de acordo com os parâmetros permitidos por legislação, análises comparativas das amostras quanto aos aspectos de aroma e sabor do produto podem ser interessantes para a escolha de um hidromel que agrade o mercado consumidor.

7.6. Análise compostos voláteis

Foi avaliado o perfil dos compostos voláteis existentes nas amostras de mosto, mel silvestre e hidromel produzido. A identificação dos compostos foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (NIST 62 library). Os compostos identificados apresentaram probabilidade de identificação igual ou maior a 90 %. Dentre os compostos identificados, destacamos os três majoritários presentes na composição das amostras (Tabela 7).

Nas amostras de hidromel foi identificada a presença de três compostos, que juntos representam cerca de 60 % da composição total dos ácidos voláteis de cada amostra: álcool fenético, álcool isoamílico e ácido succínico. Conforme observado na Tabela 7, nota-se que esses compostos não participam da composição majoritária das amostras de mosto e mel silvestre, sugerindo que sua formação ocorra durante o processo de fermentação.

Tabela 7 - Análise química dos voláteis presentes no mel, mosto e hidroméis resultantes dos processos fermentativos estabelecidos no departamento de biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP.

Substância identificada	TR	A31	A31	A31	A51	A51	A51	M05	M05	M05	MOSTO 1	MOSTO 2	MOSTO 3	MEL
	(min.)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	11/03/21 (%)	08/06/21 (%)	27/10/21 (%)	(%)
Álcool isoamílico	10,45	32,25	47,15	45,28	40,89	1,64	20,57	21,83	20,87	26,05	-	-	-	-
Glycidol	19,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,19	5,05	5,62	4,24
Furfural	20,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,43
Óxido <i>Cis</i> -Linalool	20,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,81	3,80	3,81	4,45
Ácido succínico	29,24	20,47	7,53	3,86	10,14	24,24	8,49	17,79	10,74	4,93	-	-	-	-
Ceto-isoforona	29,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,63	1,29	1,46	3,45
Álcool fenetílico	38,51	10,46	14,51	21,80	16,30	52,14	31,18	29,25	32,19	21,92	-	-	-	0,31

Legenda: A31 = hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa *Saccharomyces cerevisiae* A31; A51 = hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa *Rhodotorula mucilaginosa* A51; M05 = hidromel resultante do processo fermentativo a partir da cepa *Saccharomyces cerevisiae* M05; F= fermentação; TR = tempo de retenção.

O álcool fenetílico ($C_8H_{10}O$) foi detectado em todas as amostras de hidromel analisadas e conta entre 10,46 – 52,14 % da composição das amostras, a depender da levedura e fermentação, enquanto no mel apresenta menos de 1 %, deste composto, em sua composição. Esse álcool primário pode ser obtido, entre outras vias, pela redução do fenil acetato de sódio através do etanol, esse metabólito é descrito na literatura como produto da fermentação por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, e tem seu aroma definido como “rosas” (VILANOVA DE LA TORRE *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013).

Constatou-se a presença de álcool isoamílico ($C_5H_{12}O$) em porcentagens que variaram entre 1,64 – 47,15 % da composição das amostras. Este composto é um dos isômeros do álcool amílico, pode ser formado pelo processo de fermentação a partir de isoleucina por meio de reações de desaminação e descarboxilação, por isso sua taxa de produção depende não apenas da concentração de levedura, mas também do teor de aminoácidos do meio. A presença desse álcool é um importante componentes de sabor em bebidas alcoólicas e seu aroma característico é identificado como alcoólico, fermentado e maltado (PARK *et al.*, 2013). Estudos sugerem que os álcoois superiores podem estar relacionados com características aromáticas positivas no vinho quando em concentrações inferiores a 300 mg/L, porém, podem mascarar os outros aromas do vinho quando em altas concentrações (WELKE *et al.*, 2014).

Outro volátil presente em todos os hidroméis obtidos durante a execução desse trabalho, é o ácido succínico ($C_4H_6O_4$) que teve sua identificação entre 3,86 – 20,47 %, nas amostras analisadas. Esse ácido se apresenta como um ácido dicarboxílico, saturado, de cadeia normal, e resulta da oxidação de cada um dos grupos metil terminais do butano. Considerado um metabólito intermediário no ciclo do ácido cítrico, é formado durante a fermentação alcoólica durante a fase oxidativa do ciclo de Krebs. Devido ao estresse causado pela fermentação e a alta concentração de substrato, a atividade mitocondrial é reprimida e inibe que o ácido succínico se transforme em fumarato e interrompendo a continuidade no ciclo de Krebs, sendo por sua vez acumulando (ROSSI; HAUBER; SINGER, 1964).

Embora alguns estudos sugiram que o perfil de compostos voláteis pode ser uma ferramenta útil para caracterização da origem botânica do mel, há limitações quanto ao mel silvestre, uma vez que o produto não é uniforme e depende

principalmente de fatores como as fontes de néctar, a sazonalidade da colheita e o armazenamento. Sendo assim cada lote de mel apresenta um perfil de compostos voláteis único (JERKOVIĆ; KUŠ, 2014). O que é maravilhoso na ampliação do *bouquet* de aromas e sabores, entretanto compromete a “estabilidade” no que tange a padronização do produto a ser comercialmente explorado.

O perfil de compostos voláteis do mel apresentou a identificação dos seguintes compostos majoritários: glycidol ($C_3H_6O_2$), óxido *cis*-linalol ($C_{10}H_{18}O_2$), ceto-isoforona ($C_9H_{12}O_2$) e furfural ($C_5H_4O_2$). Nota se que embora o composto furfural represente 7,43 % da composição da amostra de mel, esse composto não foi detectado nas amostras de mosto e de hidromel.

O furfural ($C_5H_4O_2$) e o 5-hidroximetil-furfural (HMF) ($C_6H_6O_3$) são compostos orgânicos derivados de furano (C_4H_4O), enquanto o furfural apresenta um grupo aldeído (CHO) ligado ao anel furano, o HMF possui um grupo hidroximetil (CH_2OH) ligado ao mesmo anel. A presença de furfural está relacionado com a composição do aroma do mel e de bebidas como conhaques, vinhos e bebidas envelhecidas em barris de madeira, enquanto o aumento da concentração do HMF está relacionado com reações que promovem mudanças na cor, principalmente naqueles alimentos que sofrem reação de Maillard. Embora existam trabalhos que visem estabelecer concentrações máximas desses compostos, sua toxicidade em seres humanos ainda não é bem conhecida (AZEVEDO *et al.*, 2007). Concentrações de furfural em alimentos tem ocorrência natural e variam, por exemplo em vinhos de 2 a 30 ppm, e em café de 55 a 255 ppm, segundo tabela fornecida pela World Health Organization (WHO, 2000).

A presença de furfural no mel tem sido relacionada à atividade antioxidante desta substância. De acordo com alguns estudos, o teor de furfural pode ser maior em méis escuros, uma vez que este composto está associado aos componentes de aroma e coloração deste tipo de mel. Dessa forma, sugere-se que o teor de furfural pode ser utilizado como um parâmetro para avaliar a qualidade e a atividade antioxidante do mel (COCO *et al.*, 1996).

O HMF é outro composto encontrado no mel que pode ser influenciado pelas condições de armazenamento do produto. Estudos indicam que o HMF não é encontrado em méis frescos, mas é formado durante o processo de estocagem em

temperaturas elevadas. No entanto, é importante ressaltar que as condições climáticas de cada região podem influenciar na formação deste composto, uma vez que a temperatura ambiente pode variar consideravelmente entre diferentes regiões do Brasil (DA SILVA *et al.*, 2020).

Na literatura muito se discute sobre a presença de HMF uma vez que este composto pode ser um marcador de qualidade para mel, segundo GRANADOS (1996) a relação Furfural/HMF pode indicar a origem do HMF, que pode ser proveniente da termólise da celulose (Furfural/HMF > 1) ou como consequência do caramelo adicionado como agente corante (Furfural/HMF < 1) (GRANADOS *et al.*, 1996).

Os demais compostos presentes nas amostras de mel e mosto, foram o glycidol (C₃H₆O₂), o óxido *cis*-linalol (C₁₀H₁₈O₂) e a ceto-isoforona (C₉H₁₂O₂). Estudos sugerem que estes compostos são considerados importantes para a identidade do mel em diferentes regiões do mundo. Embora presentes em pequenas proporções, esses compostos contribuem para a caracterização do aroma e sabor do mel. Portanto, a presença desses compostos é relevante para a indústria apícola, que busca produzir méis com características sensoriais específicas (MACHADO DE-MELO *et al.*, 2018).

Estes compostos são produzidos pelas plantas que as abelhas visitam e sua presença no mel pode estar relacionada diretamente ou indiretamente com as fontes florais. Alguns compostos, como o óxido de rosa e o éter de tilia, foram detectados tanto no néctar quanto no mel, sugerindo que passam da flor para o mel sem sofrer modificações pelas abelhas. Já outros compostos, como os derivados de linalol, o hotrienol e os aldeídos de lilás, são modificados pelas abelhas. Portanto, a análise da composição dos compostos voláteis nos méis pode fornecer informações valiosas sobre as fontes florais que as abelhas visitaram e sobre as possíveis modificações que os compostos sofrem durante o processo (DA SILVA *et al.*, 2016). Neste estudo, constou-se a presença do o óxido *cis*-linalol (C₁₀H₁₈O₂) em todas as amostras de mel utilizadas para a produção do mosto a ser fermentado (Tabela 7) e diferente dos compostos glycidol (C₃H₆O₂) e ceto-isoforona (C₉H₁₂O₂), a quantificação relativa desse composto manteve-se estável nas três amostras analisadas.

O conhecimento da composição dos compostos voláteis presentes no hidromel é uma ferramenta essencial para a compreensão da preferência sensorial dos consumidores. A preferência por uma bebida pode estar diretamente relacionada à

sua composição química, uma vez que os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma e sabor da bebida. Portanto, a análise da composição dos compostos voláteis do hidromel pode ajudar a definir qual das bebidas elaboradas mais agrada o paladar dos consumidores, permitindo que as empresas ajustem seus processos de produção e desenvolvam produtos que atendam às expectativas do mercado consumidor (MILESKI, 2016).

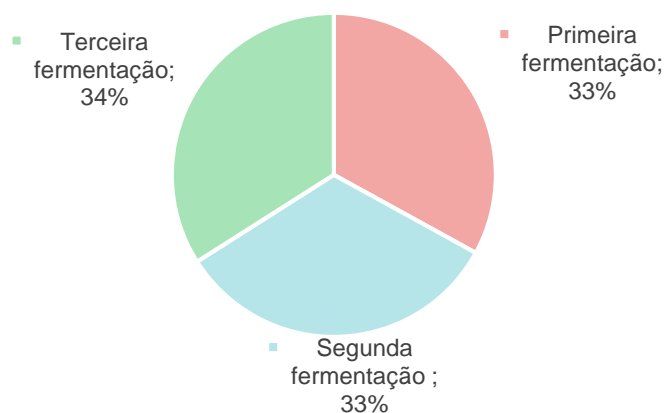
7.7. Análise sensorial

Os testes sensoriais com consumidores são uma ferramenta essencial para a indústria alimentícia, uma vez que permitem avaliar de forma objetiva a aceitação e a preferência dos consumidores em relação aos diferentes atributos sensoriais de um produto (DUTCOSKY, 2011). Essa informação é fundamental para o desenvolvimento de produtos mais adequados ao público-alvo, com maior potencial de sucesso no mercado.

Com o intuito de avaliar a aceitação de hidromel produzido por diferentes linhagens de leveduras, foram disponibilizadas três amostras da bebida, todas elas fermentadas a partir de um mesmo mosto. Os participantes foram convidados a avaliar cada amostra em relação às características de aparência, aroma, sabor e teor alcoólico, além de expressar uma opinião geral sobre o produto. As amostras também foram classificadas em ordem de preferência pelos consumidores e sua intenção de compra em relação ao hidromel foram igualmente avaliadas.

As fermentações foram realizadas em triplicata, gerando três lotes de cada um dos produtos que foram apresentados à avaliação dos consumidores. As amostras foram igualmente distribuídas entre os avaliadores (Gráfico 4), e os resultados obtidos indicaram que não houve diferença significativa nas respostas dos consumidores para os diferentes lotes de hidromel, na ANOVA $p > 0,05$.

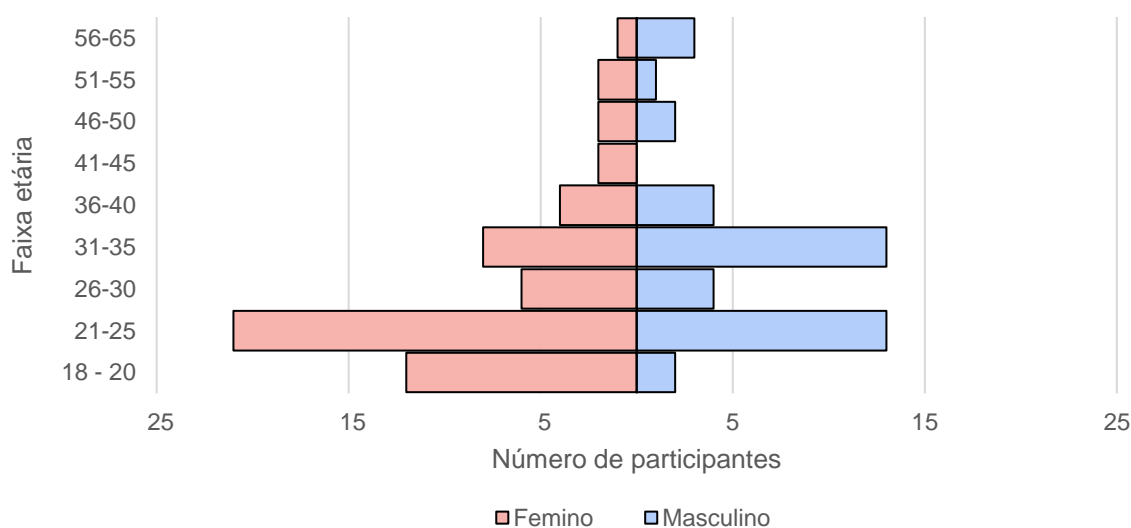
Gráfico 4 - Porcentagem de participantes distribuídos por fermentação.



Fonte: Elaboração própria (2023).

O perfil dos avaliadores em relação à idade e gênero pôde ser demonstrado no Gráfico 5. Quanto ao sexo dos participantes da pesquisa, o público predominante foi feminino. Foram 58 mulheres e 42 homens, o que é representativo da população brasileira, predominantemente feminina, representada por 52 e 48 %, mulheres e homens, respectivamente (IBGE, 2021). A distribuição etária dos avaliadores varia, conforme evidenciado pelo Gráfico 5, sendo que o maior número de participantes se concentrou na faixa etária entre 21 e 25 anos, com a contabilização de 21 mulheres e 13 homens, 44 % dos avaliadores.

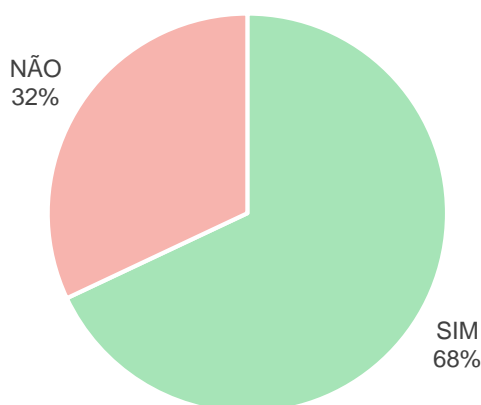
Gráfico 5 - Distribuição dos avaliadores por idade e sexo.



Fonte: Elaboração própria (2023).

Os resultados obtidos na pesquisa indicaram que, quando questionados se já haviam experimentado hidromel anteriormente, 68 % dos avaliadores informaram que era a primeira vez que provavam a bebida, enquanto 32 % afirmaram já terem bebido hidromel anteriormente. Essa distribuição é apresentada no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Proporção de avaliadores quanto ao consumo de hidromel.



Fonte: Elaboração própria (2023).

A seguir estão apresentados os resultados dos testes afetivos conduzidos durante as avaliações sensoriais das amostras do produto hidromel. Vale ressaltar que, a partir desse momento, as amostras de hidromel encontram-se identificadas como: 310, 510 e 050 representativas dos hidroméis fermentados pelas leveduras identificadas como: A31, A51 e M05, respectivamente.

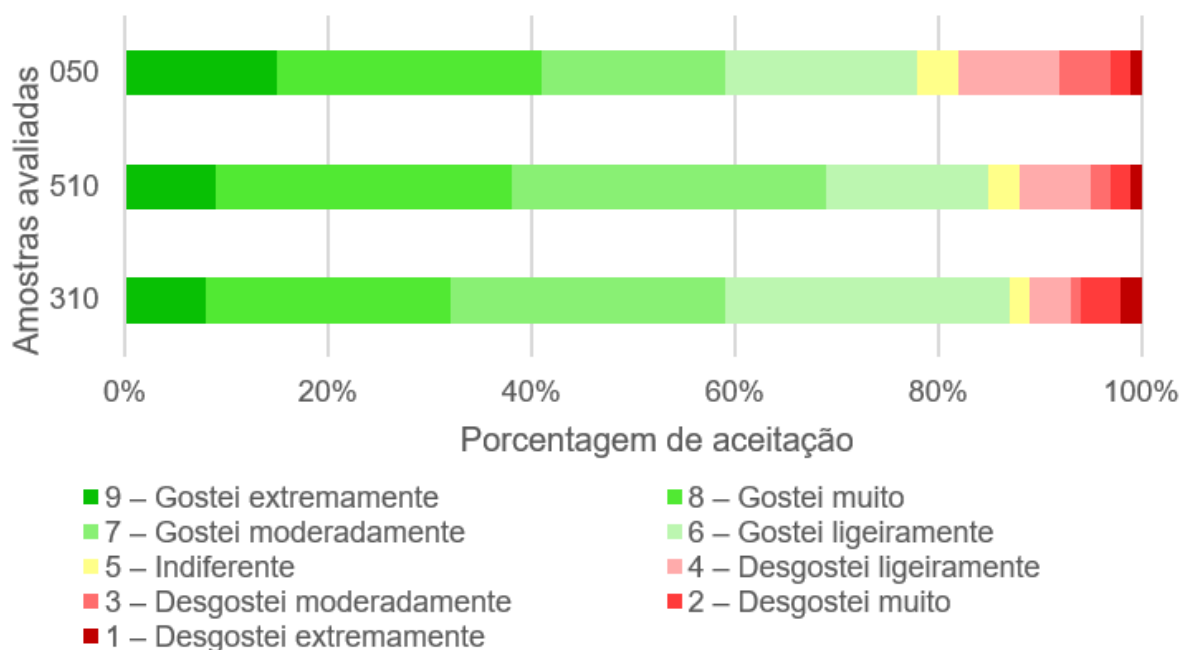
7.7.1. Teste de aceitação

Para o teste de aceitação foi utilizado o método de escala hedônica verbal estruturada com 9 pontos que varia de 1 (desgostei extremamente) até 9 (gostei extremamente), foram avaliadas as características sensoriais de aparência, aroma, sabor, teor alcoólico e impressão geral sobre o produto.

Ao analisar a categoria impressão geral do produto (Gráfico 7), foi constatado que aproximadamente 80 % dos avaliadores julgaram o produto com notas entre 6 e 9, o que indica níveis de satisfação que variam de "gostei ligeiramente" a "gostei extremamente". Esse resultado expressa o potencial de expansão e aceitabilidade do

mercado consumidor. Embora a amostra 050 tenha apresentado uma porcentagem menor de níveis de gostei, ela se destacou por ter obtido a maior número de avaliações de "gostei extremamente" (9). Entretanto, apesar da aceitação do produto pelos possíveis consumidores, as diferenças entre as amostras não foram consideradas significativas segundo ANOVA, $p > 0,05$.

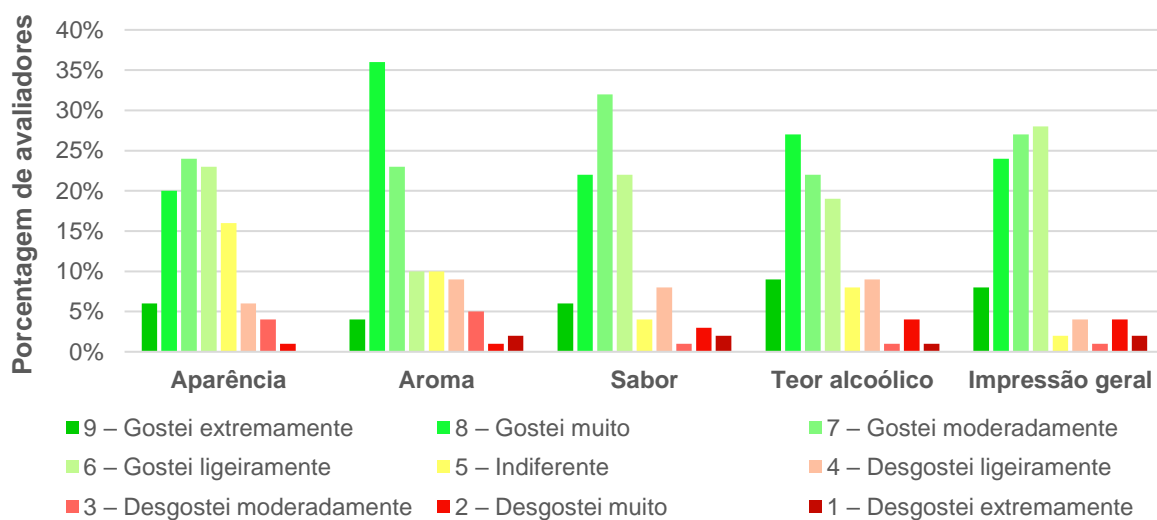
Gráfico 7 - Distribuição das notas da escala hedônica para impressão geral.



Fonte: Elaboração própria (2023).

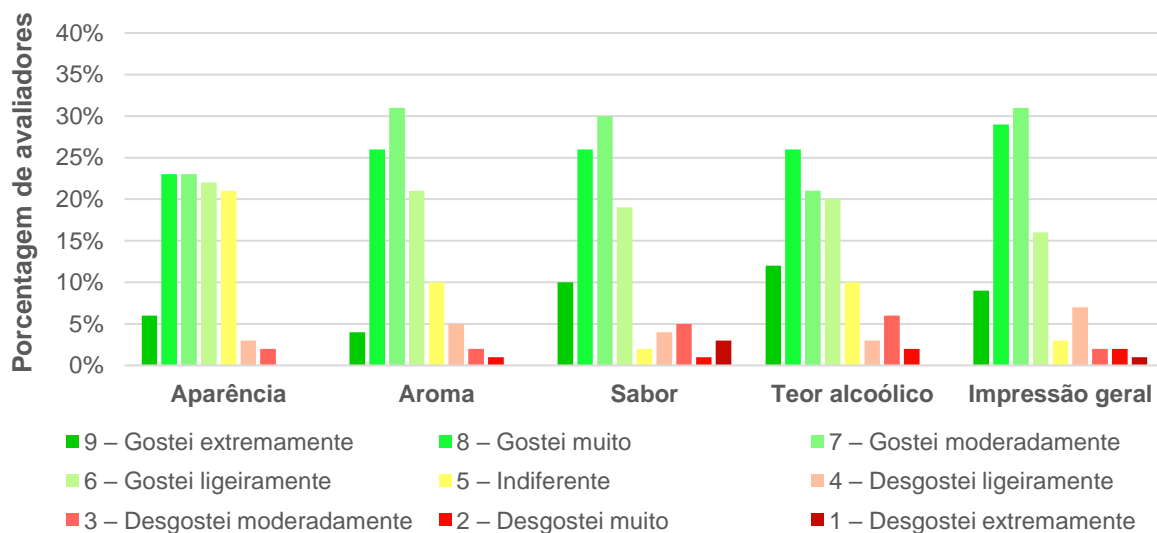
No teste de aceitação, as amostras foram avaliadas individualmente quanto a cinco atributos: aparência, aroma, sabor, teor alcoólico e impressão geral. As percepções dos avaliadores em relação às amostras foram ranqueadas utilizando-se uma escala de nove pontos, variando de 1 - "Desgostei extremamente" a 9 - "Gostei extremamente". Os resultados obtidos para cada amostra foram apresentados nos Gráficos 8, 9 e 10.

Gráfico 8 - Percepção dos consumidores sobre a amostra 310.



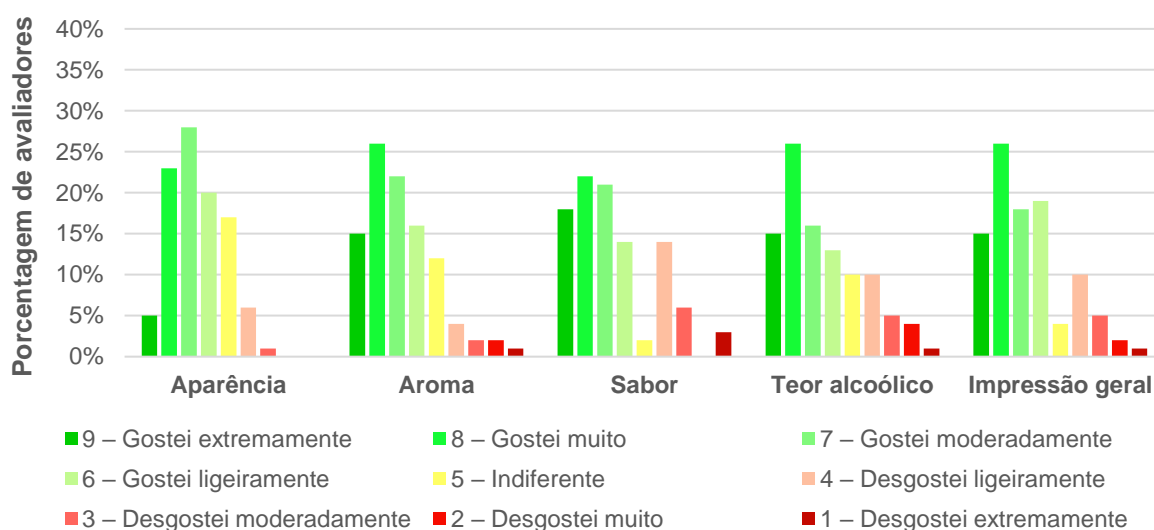
Fonte: Elaboração própria (2023).

Gráfico 9 - Percepção dos consumidores sobre amostra 510.



Fonte: Elaboração própria (2023).

Gráfico 10 - Percepção dos consumidores sobre amostra 050.



Fonte: Elaboração própria (2023).

Os resultados obtidos no estudo de aceitação do hidromel são interessantes e apontam para uma aceitação moderada a alta do produto pelos consumidores avaliados. No entanto, é importante ressaltar que as diferenças entre as médias da pontuação das amostras não foram significativas, segundo ANOVA $p > 0,05$, indicando que as diferentes linhagens de leveduras utilizadas na fermentação não impactaram de forma significativa nas características sensoriais do produto percebidas pelos avaliadores não treinados.

Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com outras pesquisas na área, as quais também indicam que a escolha da cepa de levedura pode não ser o principal fator determinante na qualidade sensorial do hidromel. É importante ressaltar que outros atributos influenciam no perfil sensorial do hidromel, tais como: o tipo de mel, as condições de envelhecimento e o teor alcoólico. Esses fatores podem influenciar significativamente as suas características sensoriais, incluindo aroma, cor e sabor. Além da adição de outros ingredientes, como frutas, especiarias ou ervas, que podem afetar a qualidade sensorial do hidromel (LI; SUN, 2019; MILESKI, 2016; STAROWICZ; GRANVOGL, 2020).

Ao avaliar sensorialmente o hidromel, é comum que alguns parâmetros, como aparência, aroma, impressão geral e sabor, não apresentem diferenças significativas entre os tratamentos. Isso ocorre porque muitos avaliadores não são consumidores habituais do produto, bem como não estão treinados o suficiente para distinguir

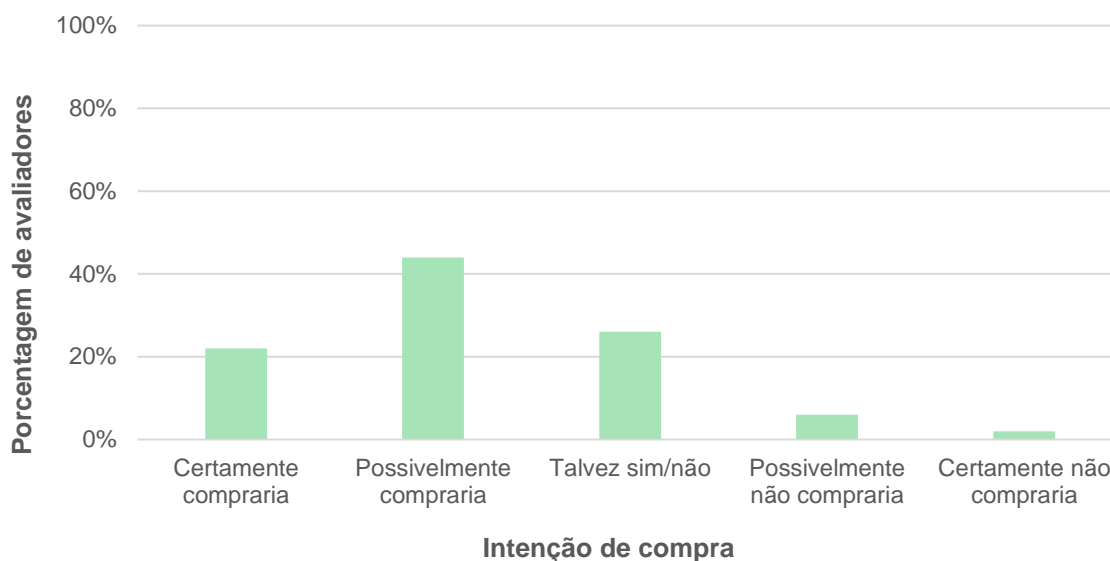
pequenas diferença entre as amostras. Um estudo recente de OUROS *et al.* (2021), comparou hidromel tradicional e os hidroméis produzidos com adição do epicarpo de lima ácida, laranja e tangerina, não foi observado diferenças significativas para os atributos de aparência, sabor e avaliação global. Similarmente, o estudo de MILESKI (2016) buscou avaliar a influência da cepa de levedura na qualidade sensorial do hidromel, foram avaliadas três amostras sendo uma fermentada com levedura não específica para hidromel e duas com leveduras comerciais específicas. A avaliação sensorial mostrou que não houve diferenças significativas nos quesitos aroma e cor ($p > 0,05$), porém a levedura não específica (Fleischmann®) obteve pontuação de sabor significativamente maior do que as leveduras comerciais Red Star champagne® e Lalvin® EC 1118, além de maior pontuação na intenção de compra com avaliadores não treinados.

Nesse contexto, é importante destacar que, embora a escolha dos ingredientes, processos e cepas, utilizados na produção de hidromel, possa afetar suas características sensoriais, a avaliação de preferência dos consumidores assume um papel primordial na decisão de compra. Isso se deve ao fato de que os consumidores geralmente orientam sua escolha com base em suas percepções de gosto, em vez de análises científicas. Portanto, é fundamental considerar as preferências dos consumidores para se conduzir a produção de hidroméis com aceitabilidade e alta qualidade.

7.7.2. Avaliação de intenção de compra

Para a avaliação do teste de atitude, os consumidores classificaram a sua intenção de compra do hidromel em uma escala verbal de 5 pontos, onde 1 representava a certeza de não comprar e 5 representava a certeza de comprar. A distribuição dos resultados foi apresentada no Gráfico 11.

Gráfico 11 -Distribuição global da intenção de compra do produto hidromel.



Fonte: Elaboração própria (2023).

Apesar de 68 % dos participantes terem experimentado o produto pela primeira vez, 66 % dos avaliadores apresentaram intenções de compra do hidromel, enquanto apenas 8 % afirmaram que não comprariam o produto. O intervalo de confiança da proporção á nível de confiança 95 % ($\alpha = 0,05$) encontrado foi $0,66 \pm 0,09$. Esses resultados reforçam a nossa hipótese que embora o hidromel seja um produto pouco conhecido, apresenta um grande potencial de mercado consumidor.

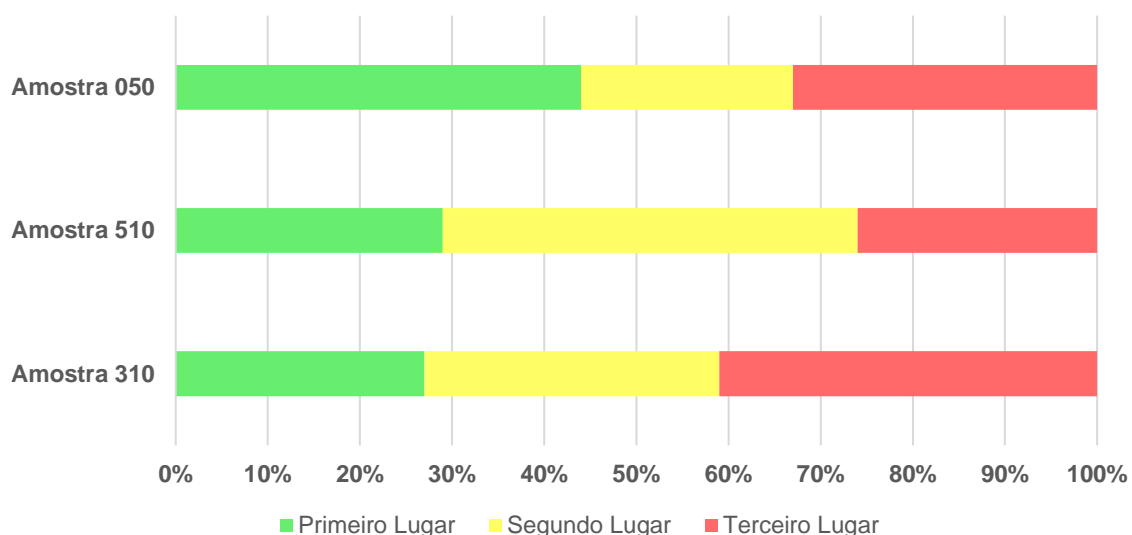
7.7.3. Teste de preferência

No teste de preferência, os avaliadores foram solicitados a classificar as três amostras simultaneamente, de acordo com sua preferência, usando a escala de 1 (para a amostra mais preferida), 2 (para a amostra intermediária) e 3 (para a amostra menos preferida).

A análise dos resultados foi realizada por meio do teste não paramétrico de Friedman, utilizando a tabela de NEWELL e MACFARLANE (1987), para determinar se houve diferença significativa entre as amostras. A diferença entre as somas das classificações foi menor que o valor crítico tabelado, indicando que não houve diferença significativa entre as amostras no nível de significância de 5 %.

A distribuição das classificações apresentadas no Gráfico 12, mostra que 44 % dos avaliadores classificaram a amostra 050 como a mais preferida, enquanto 29 % classificou a amostra 510 como a mais preferida e 27 % apontaram a amostra 310 como a mais preferida.

Gráfico 12 - Distribuição de preferência do consumidor.



Fonte: Elaboração própria (2023).

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar que a amostra 050 foi a preferida dos avaliadores, seguida pela amostra 510 e pela amostra 310. A diferença entre a preferência pela amostra mais preferida e a segunda mais preferida foi maior quando comparada a diferença entre a segunda e a terceira mais preferida. Essas informações poderão orientar futuras decisões de desenvolvimento de produtos, a partir das leveduras selecionadas nesse trabalho, a fim de atender às preferências dos consumidores.

Outro parâmetro considerado foi a preferência do produto por gênero, entretanto, quando realizadas as análises ANOVA, não houve significância com o $p > 0,05$. Essa observação sugere que, mesmo quando se considera a segmentação por gênero, não há uma prevalência de interesse por uma das amostras, mas sim uma identificação geral com o produto.

8. Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a produção de hidromel a partir de mel silvestre, utilizando leveduras selecionadas, apresenta um promissor potencial para o mercado de bebidas. Os resultados demonstraram que as leveduras selecionadas foram capazes de fermentar o hidromel dentro do esperado, resultando em um produto que atende aos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas, nas análises de variância realizadas, entre os hidroméis fermentados pelas distintas leveduras, a utilização de tecnologia acessível e leveduras selecionadas possibilita a produção de um hidromel de qualidade e com características sensoriais agradáveis aos consumidores. Ademais, a presença de leveduras não-*Saccharomyces*, da microbiota do mel silvestre, como a *Rhodotorula*, pode expandir ainda mais as possibilidades de produção e diversificação de produtos. Diante do exposto, a hipótese deste trabalho foi confirmada. Constatamos que a produção de hidromel pode ser uma excelente oportunidade de negócio para o pequeno produtor de mel, agregando valor ao seu produto. Por fim, é possível afirmar que o presente estudo contribui para o desenvolvimento, estabelecimento e padronização de práticas biotecnológicas que possam beneficiar tanto a indústria quanto os produtores rurais, ampliando as possibilidades de produção e comercialização de produtos derivados do mel.

9. Referências

- ABEMEL. Dados Setoriais. Disponível em: <https://brazilletsbee.com.br/dados-setoriais.aspx>. Acesso em: 03/03/2023.
- AIBA, Shuichi; HUMPHREY, Arthur E.; MILLIS, Nancy F. **Biochemical engineering**. 2nd edition. Academic Press, p. 434, 1973.
- American Mead Makers Association (AMMA). Disponível em: <https://mead-makers.org/>. Acesso em: 03/03/2023.
- ARLORIO, Marco; COISSON, Jean Daniel; MARTELLI, Aldo. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. **European Food Research and Technology**, v. 209, n. 3, p. 185-191, 1999.
- AZEVÊDO, Luciana C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, v. 30, p. 1968-1975, 2007.
- BADOTTI, Fernanda Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos de metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005.
- BARRA, MP Gianelli et al. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, n. 1, p. 75-84, 2010.
- BARRY, Joseph P. et al. Two novel strains of *Torulaspota delbrueckii* isolated from the honey bee microbiome and their use in honey fermentation. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 22, 2018.
- BEDNAREK, Marta et al. Effect of different starter cultures on chemical and microbial parameters of buckwheat honey fermentation. **Food microbiology**, v. 82, p. 294-302, 2019.
- BELTRAN, Gemma et al. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 996-1002, 2005.
- BELY, Marina; SABLAYROLLES, Jean-Marie; BARRE, Pierre. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 70, n. 4, p. 246-252, 1990.
- BERGAMO, Greici et al. Physicochemical characteristics of bracinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: an approach to honey differentiation. **Food research international**, v. 116, p. 745-754, 2019.
- BOGDANOV, Stefan et al. Honey for nutrition and health: a review. **Journal of the American college of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 677-689, 2008.
- BRASIL. Decreto nº 6871 de 4 de julho de 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2009.
- BRASIL. Instrução Normativa MAPA nº 34, de 29/11/2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2012.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 20 de Outubro de 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2000.
- BRASIL. Lista de estabelecimentos registrados como produtores de hidromel. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Consolidação das normas de bebidas, fermentado, acético, vinho e derivados da uva e do vinho: Anexo à norma interna DIPOV nº 01/2019 – Cartilhão / Cordenação geral de vinhos e bebidas. Brasília, 2023.

BRASIL. Portal da Transparência do Governo Federal: banco de dados. Brasília, 2022. Disponível em: <<https://www.portaltransparencia.gov.br/>> (acesso em 20/07/2022).

BURA, Renata; VAJZOVIC, Azra; DOTY, Sharon L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.

CARVALHO, C.M. et al. Yeast species associated with honey: different identification methods. **Archivos de zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 103-113, 2010.

CASTRO-VÁZQUEZ, Lucia et al. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 1022-1030, 2009.

CASTRO-VÁZQUEZ, Lucia; DÍAZ-MAROTO, M. Consuelo; PÉREZ-COELLO, M. Soledad. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4809-4813, 2006.

CAVALCANTE DA SILVA, Samira Maria Peixoto. et al. Production and characterization of mead from the honey of *Melipona scutellaris* stingless bees. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 2, p. 194-200, 2018.

CHAVES, José Benício Paes; SPROESSER, Renato Luis. **Práticas de Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas**. 1ª. ed. Viçosa, MG: UFV, v. 1, 2013.

CHEN, Yi-Ching et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4042-4051, 2001.

CIANCIOSI, Danila et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2322, 2018.

COCO, Filippo Lo et al. High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 749, n. 1-2, p. 95-102, 1996.

COSTA SANTOS, Dyego; DE OLIVEIRA, Emanuel Neto Alves. Características físico-químicas e microbiológicas de méis de *Apis mellifera* L. provenientes de diferentes entrepostos. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 67-74, 2013.

CRÉPIN, Lucie et al. Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8102-8111, 2012.

CUENCA, Marta et al. Optimization and Kinetic Modeling of Honey Fermentation for Laboratory and Pilot-Scale Mead Production. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, p. 1-10, 2021.

CZABAJ, Sławomir et al. Effects of mead wort heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 803, 2017.

DA CRUZ, Sandra Helena et al. Morphophysiological and molecular characterization of wild yeast isolates from industrial ethanol process. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 37, p. 1422-1430, 2017.

DA SILVA Priscila Missio et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food chemistry**, v. 196, p. 309-323, 2016.

- DA SILVA, Priscila Missio et al. Stability of volatile compounds of honey during prolonged storage. **Journal of food science and technology**, v. 57, p. 1167-1182, 2020.
- DE SOUZA LIBERAL, A.T. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2005.
- DELLA-BIANCA, Bianca Eli et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.
- DEMETS, Grégoire Jean-François. **O Hidromel: Sobre a sua origem, Variedade, e a Maneira de Prepará-lo**. 1ª edição. Ribeirão Preto, SP. Editora MEAD HALL. 2020.
- DICKSON, James H. Bronze age mead. **Antiquity**, v. 52, n. 205, p. 108-113, 1978.
- DOBRE, Irina et al. Rheological behavior of different honey types from Romania. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 126-132, 2012.
- DUTCOSKY, S.D. **Análise Sensorial de alimentos**. 3ª. ed. Curitiba: Champagnat, v. 1, 2011.
- DZIADAS, Mariusz; JELEŃ, Henryk H. Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. **Analytica chimica acta**, v. 677, n. 1, p. 43-49, 2010.
- DŽUGAN, Małgorzata et al. Antioxidant activity as biomarker of honey variety. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2069, 2018.
- ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, v. 49, n. 1, p. 329-337, 1999.
- FELIPE, Anna Luiza Diniz et al. Synthesis and characterization of mead: from the past to the future and development of a new fermentative route. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 4966-4971, 2019.
- FERNANDES, Denise; LOCATELLI, Gabriel Olivo; SCARTAZZINI, Sérgio Luiz. Avaliação de diferentes estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, p. 29-42, 2009.
- FERRAZ, Flavio de Oliveira. **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- GAMERO, Amparo et al. Aromatic potential of diverse non-conventional yeast species for winemaking and brewing. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 50, 2020.
- GIBSON, Daniel G. Gene and genome construction in yeast. **Current protocols in molecular biology**, v. 94, n. 1, p. 3.22. 1-3.22. 17, 2011.
- GOMES, Teresa et al. Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 65, n. 2, 2015.
- GOMES, Teresa et al. Optimization of mead production using response surface methodology. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 680-686, 2013.
- GOOGLE MAPS. **MAPA HIDROMIELERO LATINOAMERICANO**. disponível em março de 2022 no endereço: <https://www.google.com/maps/d/embed?mid=1G08S0ah7ojEI7iNLNEPDvnxYwI8WU6KK&e hbc=2E312F>
- GRANADOS, J. Quesada et al. The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. **Food chemistry**, v. 56, n. 4, p. 415-419, 1996.
- GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning. **A Laboratory Manual 4th**, 2012.

GUAGLIANONI, Dalton Geraldo. Análise sensorial: um estudo sobre procedimentos estatísticos e número mínimo de julgadores. 2009.

GUERRA, C. C. Vinho Tinto. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. cap. 11, p 209- 233. São Paulo: Blucher, 2010.

GUPTA, J. K.; SHARMA, Rajesh. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. 2009.

HALL, Michael L. Brew by the numbers: add up what's in your beer. **Zymurgy**, v. 18, 1995.

HASHIZUME, T. et al. **Tecnologia do vinho**. p. 21-68, 2001.

IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, v. 2, 1985.

IBGE, 2021. Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Pesquisas por Amostra de Domicílios, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2021. Disponível em: < <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18320-quantidade-de-homens-e-mulheres.html> > (acesso em 07/03/2023).

IGLESIAS, Antonio et al. Comprehensive study of honey with protected denomination of origin and contribution to the enhancement of legal specifications. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8561-8577, 2012.

IGLESIAS, Antonio et al. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12577-12590, 2014.

ILHA, Eunice Cassanego et al. Rendimento e eficiência da fermentação alcoólica na produção de hidromel. **Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2008.

JACKSON, Ronald S. **Wine science: principles and applications**. Academic press, 2008.

JERKOVIĆ, Igor; KUŚ, Piotr Marek. Terpenes in honey: Occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. **RSC Advances**, v. 4, n. 60, p. 31710-31728, 2014.

KPMG. KPMG In Poland: **The alcoholic beverages market in Poland**. KPMG. Swiss. 2014.

LAS HERAS-VAZQUEZ, Francisco Javier et al. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2003.

LASCEVE, G., GONNET, M. Analyse por radioactivation du contenu mineral d'un miel. Possibilité de préciser son origine. *Apidologie* 5: 201-223. 1974.

LAWLESS, Harry T. et al. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Springer, 2010.

LI, Ruirui; SUN, Yuxia. Effects of honey variety and non-*Saccharomyces cerevisiae* on the flavor volatiles of mead. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 1, p. 40-53, 2019.

LILLY, M.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.2, p.744-753, 2000.

LOPES, Ana Claudia Alencar et al. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* single inoculum and mixed inoculum with *Meyerozyma caribbica* on the quality of mead. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 11, p. 2175-2185, 2020.

LUCAS, Bruna Nichelle; DALLA NORA, Flávia Michelin. Análise Sensorial De Alimentos: Aplicações Recentes. **Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos**, p. 118, 2021.

MACHADO DE-MELO, Adriane Alexandre et al. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. **Journal of apicultural research**, v. 57, n. 1, p. 5-37, 2018.

MACHADO, Alexandra M. et al. Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin: A review on their occurrence on monofloral honeys. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 374, 2020.

MARGALIT, Yair. **Concepts in wine technology: small winery operations**. Board and Bench Publishing, 2012.

MATTIETTO, R. de A. et al. Tecnologia para obtenção artesanal de hidromel do tipo doce. **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

MCGOVERN, Patrick E. et al. Fermented beverages of pre-and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17593-17598, 2004.

MEILGAARD, Morten C.; CARR, B. Thomas; CIVILLE, Gail Vance. **Sensory evaluation techniques**. CRC press, 1999.

MENDES-FERREIRA, Ana et al. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 193-198, 2010.

MEO, Sultan Ayoub et al. Role of honey in modern medicine. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n.5, p. 975-978, 2017.

MICHEL, A.; BIZEAU, C.; DRILLEAU, J.F. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. Belg. **Journal of Food Chemistry Biotechnology**, Lunuwila, v.45, n.3, p.98-102, 1990.

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

MINIM, Valéria P.R. et al. **Análise sensorial: estudos com consumidores. rev. e ampl.** UFV, 2010.

MOE, Dagfinn; OEGGL, Klaus. Palynological evidence of mead: a prehistoric drink dating back to the 3rd millennium BC. **Vegetation history and archaeobotany**, v. 23, n. 5, p. 515-526, 2014.

MOLINET, Jennifer; CUBILLOS, Francisco A. Wild yeast for the future: exploring the use of wild strains for wine and beer fermentation. **Frontiers in Genetics**, p. 1281, 2020.

MORAES, Luís F. **O guia do hidromel artesanal**. 1ª edição. São Paulo, SP. Editora livraria da física LF. 2018.

MORAIS, P.B. et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 241-243, 1997.

MORALES, Eduardo Marin; ALCARDE, Valmir Eduardo; DE ANGELIS, Dejanira de Franceschi. Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin k1-1116). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, 2013.

MOREIRA, Ricardo FA et al. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 697-704, 2010.

NAYIK, Gulzar Ahmad; DAR, Basharat Nabi; NANDA, Vikas. Optimization of the process parameters to establish the quality attributes of DPPH radical scavenging activity, total phenolic content, and total

- flavonoid content of apple (*Malus domestica*) honey using response surface methodology. **International journal of food properties**, v. 19, n. 8, p. 1738-1748, 2016.
- NEVOIGT, Elke. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.
- NEWELL, G. J.; MACFARLANE, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food science*, v. 52, n. 6, p. 1721-1725, 1987.
- NILSSON, R. Henrik et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary bioinformatics**, v. 4, p. EBO. S653, 2008.
- NOGUEIRA, Alessandro et al. Slow fermentation in French cider processing due to partial biomass reduction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 102-110, 2008.
- OLIVEIRA, Lucas Mendes et al. Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **Geoambiente on-line**, n. 19, p. 01-23. 2012.
- OUROS, Lucas Felipe et al. Produção, análise físico-química e sensorial de hidroméis com laranja, tangerina e lima ácida. **Energia na Agricultura**, v. 36, n. 4, p. 504-511, 2021.
- PARK, Hye-Jung et al. Characterization of volatile components in Makgeolli, a traditional Korean rice wine, with or without pasteurization, during storage. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5317-5325, 2013.
- PASCUAL-MATE, Ana et al. Methods of analysis of honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 1, p. 38-74, 2018.
- PEREIRA, Ana Paula et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization on mead production. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 21-30, 2014.
- PEREIRA, Ana Paula et al. Mead and other fermented beverages. *In: Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, p. 407-434. 2017.
- PEREIRA, Ana Paula et al. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2057-2063, 2009.
- PEREIRA, Ana Paula et al. Volatile composition and sensory properties of mead. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 404, 2019.
- PEREIRA, Ana Paula Rodrigues. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel**. Dissertação (Mestrado em segurança e qualidade alimentar). Instituto Politecnico de Bragança. Bragança. 2008.
- PERYAM, David R.; GIRARDOT, N.F. Advanced taste-test method. **Food. Engineering**, v. 24, p. 194, 1952.
- PIATZ, Steve. **The complete guide to making mead: the ingredients, equipment, processes, and recipes for crafting honey wine**. Voyageur Press, 2014.
- RAMALHOSA, Elsa et al. Mead production: Tradition versus modernity. **Advances in food and nutrition research**, v. 63, p. 101-118, 2011.
- REIS, Vanda Renata et al. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47-48, p. 1-7, 2016.
- RIBEIRO, Maycon Vinícius de Senna; OLIVO, José Eduardo; ELLER, Monique Renon. Fed-Batch and Staggered Nutrient Addition: An Improved Method for Mead Production. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 133-138, 2020.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal et al. **Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications**. John Wiley & Sons, 2006.

RIZZON, Luiz Antenor; MIELE, Alberto. Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. **Ciência Rural**, v. 26, p. 297-300, 1996.

ROSA, Daniel Dias et al. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5.8 S rDNA. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v. 25, n. 2, p. 429-434, 2003.

ROSSI, Cristiano; HAUBER, Joseph; SINGER, Thomas P. Mitochondrial and cytoplasmic enzymes for the reduction of fumarate to succinate in yeast. **Nature**, v. 204, p. 167-170, 1964.

SAKAČ, Nikola; SAK-BOSNAR, Milan. A rapid method for the determination of honey diastase activity. **Talanta**, v. 93, p. 135-138, 2012.

SANTOS, Angela Alves et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

SCHULLER, Dorit; CASAL, Margarida. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 292-304, 2005.

SE, Kuan Wei et al. Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 80, p. 16-32, 2019.

SILVA, Mayara Salgado. Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade Federal de Viçosa. Viçosa. 2016.

SILVA, Rosimeire Oenning da; BATISTOTE, Margareth; CEREDA, Marney Pascoli. Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 161-169, 2013.

SORIA, Ana Cristina; MARTÍNEZ-CASTRO, Isabel; SANZ, Jesús. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 838-848, 2008.

SOTTIL, Claire et al. Using *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 12, p. 2705-2714, 2019.

SROKA, Paweł; TUSZYŃSKI, Tadeusz. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1250-1257, 2007.

STAROWICZ, Małgorzata; GRANVOGL, Michael. Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. **Trends in food science & Technology**, v. 106, p. 402-416, 2020.

STEINKRAUS, Keith H.; MORSE, Roger A. Factors influencing the fermentation of honey in mead production. **Journal of Apicultural Research**, v. 5, n. 1, p. 17-26, 1966.

STEWART, Graham G. *Saccharomyces* species in the Production of Beer. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 34, 2016.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Sensory Evaluation Practices-Food Science and Technology. **vol. 4th edition, Elsevier Academic Press., Boston, USA, 2004.**

SUMBY, Krista M.; GRBIN, Paul R.; JIRANEK, Vladimir. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 1–16, 2010.

TORREA, Diego et al. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice—Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Food chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1072-1083, 2011.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TRIOLA, Mario F. Introdução à estatística. In: **Introdução à estatística**. 2008. p. xxvi, 310.

TWILLEY, John; JUTZI, Chase; TOMASINO, Elizabeth. Influence of fermentation temperature and nutrient addition on chemical and sensory characteristics of traditional honey wine. **Annals of Food Processing and Preservation**, 2018.

VALENTE, Patricia et al. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. **FEMS Microbiology letters**, v. 137, n. 2-3, p. 253-256, 1996.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2021.

VIDAL, Maria de Fátima. Evolução da Produção de Mel na área de atuação do BNB. 2020. Acesso disponível < bnb.gov.br >

VILANOVA DE LA TORRE, Mar et al. Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. **Microchemical Journal**, v.95, p. 240-246, 2010.

WALKER, Graeme M.; WALKER, Roy SK. Enhancing yeast alcoholic fermentations. **Advances in applied microbiology**, v. 105, p. 87-129, 2018.

WANG, D. et al. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, n. 4, p. 340-346, 2004.

WANG, Xing-Chen et al. Evaluation of aroma enhancement for “Ecolly” dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 228, p. 550-559, 2017.

WELKE, Juliane Elisa et al. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. **Food Research International**, v. 59, p. 85-99, 2014.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 42**. Food & Agriculture Org., 2000. Disponível em <<https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je03.htm>> acesso 08/03/2023.

Anexo 1 – Análise similaridade Blast

Tabela 8 - Análise similaridade Blast

Amostra	Similaridade	Gaps	e-Value	Acesso Blast	Gênero espécie
A21	704/768 (92 %)	6/768 (0 %)	0.0	KY788343.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A22	600/672 (89 %)	3/672 (0 %)	0.0	MT136559.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A31	641/754 (85 %)	9/754 (1 %)	0.0	MT136561.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
M05	506/539 (94 %)	0/539 (0 %)	0.0	KX430769.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A51	577/577 (100 %)	0/577 (0 %)	0.0	KY104846.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Fonte: Elaboração Própria (2023).

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Título: Isolamento de leveduras, produção e caracterização de Hidromel.

Pesquisadoras envolvidas: Me. Vânia Casari Mussato e Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede.

As informações contidas neste termo de consentimento livre e esclarecido, fornecida pelas pesquisadoras acima referidas, que será assinada em duas vias – uma para a pesquisadora principal e outra para o (a) voluntário (a), tem por objetivo firmar acordo escrito com o (a) voluntário (a) para a avaliação da pesquisa acima referida, autorizando sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que será submetido (a).

1 - Natureza da pesquisa: o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Isolamento de leveduras, produção e caracterização de Hidromel”. Esse trabalho tem como finalidade avaliar a influência das leveduras isoladas sobre as características da fermentação e sensoriais do hidromel obtido nessas condições. A partir dos dados gerados será possível avaliar qual dos produtos apresentou maior aceitação dos consumidores, possibilitando inferir qual o produto tem melhor qualidade. Caso decida aceitar o convite, o (a) senhor (a) receberá as fichas de avaliação sensorial, bem como as amostras de hidromel para serem provadas. O tempo previsto para sua participação é de aproximadamente 10 minutos.

2 – Participantes da pesquisa: serão convidados a participar da análise sensorial, servidores e estudantes da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Poderão participar desta pesquisa, apenas voluntários que sejam maiores de idade (18 anos ou mais), que não apresentem restrições/alergias ao consumo de bebidas alcoólicas, mel e seus derivados e que não estejam grávidas. As análises sensoriais serão realizadas no Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Caso, após a realização da análise sensorial venha a surgir alguma dúvida, o (a) senhor (a) poderá entrar em contato com as pesquisadoras a partir dos telefones e e-mail disponibilizados ao final deste TCLE.

3 – Envolvimento na pesquisa: ao participar da pesquisa o (a) senhor (a) receberá três amostras de hidromel, codificadas com números aleatórios, que serão servidas em copos plásticos transparentes contendo cerca de 20 mL. Juntamente com as amostras o (a) senhor (a) receberá as fichas de análise sensorial com instruções a respeito de como preencher e expressar suas opiniões. No teste discriminatório de ordenação, o (a) senhor (a) classificará as amostras de forma crescente após prová-las, indicando a sua preferência na ficha que será fornecida, atribuindo o valor 1 à mais preferida e o valor 3 à menos preferida. No teste afetivo, o (a) senhor (a) indicará na ficha de análise sensorial se desgostou, desgostou moderadamente, nem gostou/nem desgostou, gostou moderadamente ou gostou muito das amostras provadas. No teste afetivo de aceitação, o (a) senhor (a) indicará o quão regularmente consumiria esse produto.

4 – Riscos e desconfortos: o (a) senhor (a) deverá se identificar e não participar da pesquisa caso: não esteja habituado (a) ou não seja adepto (a) ao consumo de bebidas alcoólicas, seja menor de idade ou apresente restrições clínicas ao consumo de álcool, mel ou derivados de mel.

5 – Confidencialidade: todas as informações coletadas nesse estudo serão estritamente confidenciais. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim a sua privacidade. Porém, os resultados da pesquisa serão utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem revelar sua identidade. Os dados obtidos durante a pesquisa são confidenciais e não serão usados para outros fins.

6 – Benefícios: o (a) senhor (a) não terá nenhum tipo de despesa ao autorizar sua participação nesta pesquisa, bem como nada será pago pela sua participação. Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo contribua com informações relevantes sobre a produção de hidromel que devem acrescentar elementos importantes à literatura, pois os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos. Ao desenvolver este projeto, espera-se definir alguns parâmetros que são críticos durante os procedimentos de obtenção para que o produto gerado atenda aos critérios estabelecidos pela legislação vigente e apresente características sensoriais desejáveis ao serem colocados à disposição do consumidor.

7 – Liberdade de recusa ou retirar o consentimento: o (a) senhor (a) como voluntário (a), pode recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem qualquer penalização ou prejuízo ao tratamento a que está sendo submetido nesta instituição.

Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento e, autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo ao assinar o presente documento.

Obs: **Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.**

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da Pesquisadora Principal: Me. Vânia Casari Mussato RG: 43708117-5 contato: vania.mussato@sou.unaerp.edu.br (16) 99167-8803

Em caso de dúvidas quanto aos procedimentos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com Vânia Casari Mussato (vania.mussato@sou.unaerp.edu.br – (16) 99167-8803), doutoranda responsável pela execução do projeto “Isolamento de leveduras, produção e caracterização de Hidromel”. Em caso de dúvidas quanto aos procedimentos éticos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNAERP) – Av. Costábile Romano, 2201 – Bloco A – Campus Ribeirão Preto – Ribeirão Preto/SP – Brasil – CEP:14096-900– Tel: (16) 3603-6917 ou (16) 3603-6860 – E-mail: cetica@unaerp.br

Anexo 3 – Ficha de avaliação de análise sensorial

Ficha para avaliação do teste afetivo de aceitação e intenção de compra

Nome (apenas iniciais): _____ Data: ____/____/____

Idade: ____ anos. Sexo: () Feminino () Masculino

Você já experimentou Hidromel anteriormente? () SIM () NÃO

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, teor alcoólico e impressão geral, de acordo com a escala abaixo:

Amostra nº _____

Aparência	Aroma	Sabor
() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente
() Desgostei muito	() Desgostei muito	() Desgostei muito
() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente
() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente
() Indiferente	() Indiferente	() Indiferente
() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente
() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente
() Gostei muito	() Gostei muito	() Gostei muito
() Gostei extremamente	() Gostei extremamente	() Gostei extremamente
Teor Alcoólico		Impressão geral
() Desgostei extremamente		() Desgostei extremamente
() Desgostei muito		() Desgostei muito
() Desgostei moderadamente		() Desgostei moderadamente
() Desgostei ligeiramente		() Desgostei ligeiramente
() Indiferente		() Indiferente
() Gostei ligeiramente		() Gostei ligeiramente
() Gostei moderadamente		() Gostei moderadamente
() Gostei muito		() Gostei muito
() Gostei extremamente		() Gostei extremamente

Ficha para avaliação do teste afetivo de aceitação e intenção de compra

Amostra nº _____

Aparência	Aroma	Sabor
() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente
() Desgostei muito	() Desgostei muito	() Desgostei muito
() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente
() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente
() Indiferente	() Indiferente	() Indiferente
() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente
() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente
() Gostei muito	() Gostei muito	() Gostei muito
() Gostei extremamente	() Gostei extremamente	() Gostei extremamente
Teor Alcoólico	Impressão geral	
() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente	
() Desgostei muito	() Desgostei muito	
() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente	
() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente	
() Indiferente	() Indiferente	
() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente	
() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente	
() Gostei muito	() Gostei muito	
() Gostei extremamente	() Gostei extremamente	

Ficha para avaliação do teste afetivo de aceitação e intenção de compra

Amostra nº _____

Aparência	Aroma	Sabor
() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente
() Desgostei muito	() Desgostei muito	() Desgostei muito
() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente
() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente
() Indiferente	() Indiferente	() Indiferente
() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente
() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente
() Gostei muito	() Gostei muito	() Gostei muito
() Gostei extremamente	() Gostei extremamente	() Gostei extremamente
Teor Alcoólico		
Impressão geral		
() Desgostei extremamente	() Desgostei extremamente	
() Desgostei muito	() Desgostei muito	
() Desgostei moderadamente	() Desgostei moderadamente	
() Desgostei ligeiramente	() Desgostei ligeiramente	
() Indiferente	() Indiferente	
() Gostei ligeiramente	() Gostei ligeiramente	
() Gostei moderadamente	() Gostei moderadamente	
() Gostei muito	() Gostei muito	
() Gostei extremamente	() Gostei extremamente	

Assinale qual seria sua atitude em relação à compra do produto:

Intenção de Compra
() Certamente não compraria
() Possivelmente não compraria
() Talvez comprasse / talvez não comprasse
() Possivelmente compraria
() Certamente compraria

Ficha para Avaliação do Teste Afetivo de Preferência

Por favor, avalie as amostras fornecidas. Ordene as amostras de acordo com sua preferência, atribuindo o número:

1 – para a amostra de maior preferência,

2 – para a amostra de segunda preferência,

3 – para a amostra de terceira preferência.

Amostra nº _____	Amostra nº _____	Amostra nº _____
Nota ()	Nota ()	Nota ()