



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**KAYQUE FROTA SAMPAIO**

**PRODUÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO GRAVIOLA  
(*Annona muricata* L.) E FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*  
(L.) Walp.) COMO SUPLEMENTOS**

Feira de Santana, BA  
2019

**KAYQUE FROTA SAMPAIO**

**PRODUÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO GRAVIOLA  
(*Annona muricata* L.) E FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*  
(L.) Walp.) COMO SUPLEMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Acosta Martínez.

Feira de Santana, BA  
2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S183 Sampaio, Kayque Frota

Produção de hidromel utilizando graviola (*Annonamuricata* L.) e feijão-caupi (*Vignaunguiculata* (L.) Walp.) como suplementos / Kayque Frota Sampaio. – 2019.  
131 f.: il.

Orientador: Ernesto Acosta Martínez

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2019.

1. Hidromel – produção. 2. Graviola (*Annonamuricata* L.). 3. Feijão-caupi (*Vignaunguiculata* (L.) Walp.). 4. Mel – suplementos. I. Martínez, Ernesto Acosta, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 663.393

Luis Ricardo Andrade da Silva - Bibliotecário - CRB-5/1790

## BANCA EXAMINADORA

*César Augusto Piedrahíta Aguirre*

**Dr. César Augusto Piedrahíta Aguirre**  
(Universidade Federal da Bahia)

*Tais Silva de Oliveira Brandão*

**Dr.<sup>a</sup> Tais Silva de Oliveira Brandão**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



**Dr. Ernesto Acosta Martínez**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA**  
**2019**

## AGRADECIMENTOS

“Missão dada é missão cumprida”. Essa frase, que nomeou a minha turma de formatura em Engenharia de Alimentos (UEFS, 2015.2), nunca fez tanto sentido em minha vida quanto no período em que eu me dediquei ao Mestrado em Biotecnologia, desde a época em que estudei para a seleção que proporcionou o meu ingresso no mesmo, até os dias atuais, momento esse que, graças a Deus, estou encerrando esse ciclo importante em minha vida. O desejo de alcançar os meus objetivos foi um combustível poderoso para eu prosseguir nessa caminhada, mesmo em meio de muitos desafios, contratempos e o famoso “tempo curto” para conciliar todas as minhas responsabilidades.

Agradeço primeiramente a Deus, que me proporcionou força, paciência, fé, esperança, saúde e obstinação, enfim, por todas as graças que Ele me proporcionou para que eu conseguir prosseguir em frente nessa caminhada. Gratidão é a palavra que eu tenho por Ele! Agradeço também à minha família, sobretudo à minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, Luiz e Rafa, por todo incentivo, paciência, confiança e ajuda que eles me proporcionaram. Muito obrigado por tudo!

Estendo meus agradecimentos a pessoas muito importantes, algumas eu já conhecia e outras eu tive a oportunidade e o prazer de conhecer, que eu tive a oportunidade de conviver na UEFS nesse período em que eu cursei o Mestrado, e que dividiram muitos momentos comigo, desde os mais alegres até os mais apreensivos, mas estavam sempre lá ao meu lado. Sendo assim, agradeço à Geiza e Mashely, que começaram os trabalhos de pesquisa comigo e que eu tive a honra de trabalhar em equipe, em que um apoiava e incentivava o outro a prosseguir, e que eu tive oportunidade de construir uma amizade bonita e divertida. Não poderia deixar de citar José Francisco, que também começou os trabalhos de pesquisa na mesma época que eu, que também me ajudou quando eu precisei, e que eu pude conhecer melhor e também formar uma amizade. Agradeço também à Nara, Hevelynn e Tamires por todo apoio, amizade, companheirismo, e momentos divertidos que pudemos desfrutar juntos.

Não poderia deixar de agradecer à Thaíse, por todo apoio moral, confiança, amizade e pela ajuda que me proporcionou para que eu pudesse dar os meus primeiros passos nessa caminhada. Agradeço também a Jaque, Adriana, Gabi e Bruna, por toda ajuda e apoio moral que me deram, além da amizade, e também à Lane, Gabriel, Verena, Flávia, Célia e Ítalo, pessoas essas que eu tive a oportunidade de conhecer melhor, admirar e dividir bons momentos. Gostaria de agradecer também à Thaís Menezes, que foi minha companheira no Estágio Docência em Microbiologia de Alimentos e na disciplina de Métodos de Microbiologia, que me ajudou e deu conselhos valiosos.

Agradeço também aos funcionários da UEFS que me ajudaram, especialmente aos técnicos Antônio Luiz e Patrícia, pessoas essas que além de me ajudarem e apoiarem, em momentos fáceis e difíceis, compartilharam conhecimentos bastante produtivos comigo, e também a Elinelson, Antônio Cardoso, Dário, Daniel, Rita, Kátia e Pablo, por toda ajuda e apoio dados a mim.

Gostaria também de agradecer ao meu orientador, o Prof. Dr. Ernesto Acosta Martínez, por ter aceitado me orientar, por todo apoio e confiança que ele depositou em mim, pelo suporte oferecido e por toda a bagagem de conhecimentos que eu pude adquirir com ele. Agradeço também a outros professores que foram muito importantes nessa caminhada: à Prof. Dra. Elinalva Maciel Paulo, por toda confiança, dicas, conselhos, conhecimentos compartilhados, e pelo suporte no laboratório coordenado por ela; ao Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho, pelo apoio e suporte no laboratório em que o mesmo coordena, além dos conselhos e conhecimentos compartilhados; e à Profa. Dra. Sílvia Maria Almeida de

Souza, pelo apoio, pelo suporte no laboratório que a mesma coordena e pelas dicas e conhecimentos compartilhados.

Por fim, estendo meus agradecimentos à UEFS/FIOCRUZ, à PPGBiotec, à COOARP e a CAPES, pelas grandes parceiras proporcionadas que facilitaram o desenvolvimento do projeto de Mestrado.

## RESUMO

O mel, matéria-prima principal para a elaboração do hidromel, é abundante no Brasil, sobretudo na região Nordeste, sendo rico em açúcares fermentescíveis e deficiente em muitos nutrientes necessários para o metabolismo das leveduras na fermentação alcoólica. Por isso, o mosto de mel pode ser adicionado com suplementos comerciais, frutas em pedaços ou polpas, especiarias, dentre outros materiais que, além de proporcionar nutrientes que estimulam as leveduras ao consumo dos açúcares presentes no mosto, agregam características sensoriais diferenciadas a esta bebida. A graviola (*Annona muricata* L.) é uma fruta abundante na região Nordeste do Brasil, de sabor e aroma característicos, e que constitui uma boa fonte de açúcares, compostos fenólicos e, principalmente, de fibras. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma leguminosa bastante consumida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, facilmente encontrada comercialmente, e que possui altos teores de amido, oligossacarídeos e, principalmente, de proteínas. O trabalho teve como objetivo a obtenção de uma bebida através da fermentação alcoólica do mel com suplemento de graviola e extrato de feijão-caupi. A cepa comercial *S. bayannus* Premier Cuvée® foi selecionada em detrimento da Cotê des Blancs® (*S. bayannus*) e Safbrew Abbaye® (*S. cerevisiae*), por mostrar menor produção de sulfeto de hidrogênio. Nas fermentações sobre suplementação do mosto de mel com extrato de feijão-caupi (0, 5 e 30 g.L<sup>-1</sup>) maiores valores de concentração celular (1,97 x 10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup>), teor de etanol (14,1 ± 0,5% v/v) e de produtividade volumétrica de etanol (Q<sub>P</sub>) (0,457 ± 0,017 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) assim como menores TSS (15,6 ± 0,8 °Brix) e de açúcares redutores totais (59,6 ± 12,6 g.L<sup>-1</sup>) foram obtidos com maior concentração de extrato. Os ensaios fermentativos foram conduzidos segundo planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com três repetições do ponto central. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 ml de meio água e mel (30 °Brix) nas condições de 30 °C durante 288 h para avaliar o efeito do pH (3,5, 5,0 e 6,5), da concentração de graviola (10, 20 e 30% m/v) e do percentual de porção fibrosa de graviola (0, 25 e 50% m/m). Maiores valores de consumo de açúcares redutores (90,3%), etanol (15,5 %) e de produtividade volumétrica de etanol (0,42 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foram obtidos em mostos com pH inicial 5,0, 20% m/v de graviola e mistura de polpa líquida (75% m/m) e porção fibrosa (25% m/m). O efeito do pH e da concentração de graviola foram significativas sobre a resposta eficiência fermentativa (ε<sub>F</sub>) após 192 h de fermentação com R<sup>2</sup> igual a 0,98939. Nos resultados do planejamento composto central 2<sup>2</sup> contendo 15 ensaios, o efeito de linear da concentração de graviola foi significativo sobre Q<sub>P</sub>, com R<sup>2</sup> igual a 0,66945. Os valores críticos de concentração de graviola (16,55% m/v) e pH inicial de fermentação (4,86) a 288 h de fermentação proporcionaram o valor ótimo de produtividade volumétrica de etanol (0,410 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Na fermentação do mosto de mel em escala laboratorial ampliada, utilizando as condições críticas estabelecidas anteriormente obteve-se um hidromel contendo: concentração celular máxima (7,07 x 10<sup>7</sup> cel/mL); etanol (14,1 %) e; Q<sub>P</sub> (0,385 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Da avaliação do efeito da bentonite hidratada, do carvão ativado e da carboximetilcelulose (CMC), concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>, sob a clarificação do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada, constatou-se que, ao final de 360 h, o hidromel mais límpido foi o com adição de CMC (1,5 g.L<sup>-1</sup>), com aumento da transmitância de 10,4 ± 0,5%. É possível produzir hidromel utilizando graviola e extrato de feijão caupi que podem substituir suplementos normalmente utilizados na produção de hidroméis, diminuindo assim os custos do processo fermentativo e gerando um melhor aproveitamento dessas matérias-primas.

**Palavras-chave:** Mel, graviola, feijão-caupi, *Saccharomyces*, hidromel.

## ABSTRACT

Honey, the main raw material for the elaboration of mead, is abundant in Brazil, especially in the Northeast region, being rich in fermentable sugars and deficient in many nutrients needed for yeast metabolism in alcoholic fermentation. Therefore, the honey must be added with commercial supplements, fruit in pieces or pulps, spices, among other materials that, in addition to providing nutrients that stimulate yeasts to the consumption of sugars present in the wort, add differentiated sensory characteristics to this beverage. The soursop (*Annona muricata* L.) is an abundant fruit in the northeastern region of Brazil, with characteristic flavor and aroma, which constitutes a good source of sugars, phenolic compounds and, mainly, fibers. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is a leguminous species widely consumed in the north and northeast regions of Brazil, easily found commercially, and has high levels of starch, oligosaccharides and, mainly, proteins. The objective of this work was to obtain a drink through the alcoholic fermentation of honey with soursop supplement and cowpea extract. The commercial strain *S. bayanus* Premier Cuvée® was selected to the detriment of Cotê des Blancs® (*S. bayanus*) and Safbrew Abbaye® (*S. cerevisiae*), for showing lower production of hydrogen sulfide. In fermentations on honey wort supplementation with cowpea extract (0, 5 and 30 g.L<sup>-1</sup>) higher cell concentration values (1.97 x 10<sup>8</sup> cel.mL<sup>-1</sup>), ethanol content (14.1 ± 0.5% v/v) and ethanol volumetric yield (Q<sub>P</sub>) (0.457 ± 0.017 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) as well as lower TSS (15.6 ± 0.8 °Brix) and total reducing sugars (59.6 ± 12.6 g.L<sup>-1</sup>) were obtained with higher extract concentration. The fermentative assays were conducted according to a 2<sup>3</sup> factorial design with three replications of the central point. The experiments were carried out in Erlenmeyer vials of 500 mL containing 250 ml of half-water and honey (30 ° Brix) under conditions of 30 °C during 288 h to evaluate the effect of pH (3.5, 5.0 and 6.5), soursop concentration (10, 20 and 30% w/v) and percentage of fibrous portion soursop (0, 25 and 50% w/w). Higher consumption values of reducing sugars (90.3%), ethanol (15.5%) and ethanol volumetric yield (0.42 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) were obtained in musts with initial pH 5.0, 20% w/v of soursop and mixture of liquid pulp (75% w/w) and fibrous portion (25% w/w). The effect of pH and soursop concentration was significant on the response to fermentative efficiency (ε<sub>f</sub>) after 192 h of fermentation with R<sup>2</sup> equal to 0.98939. In the results of the central composite planning 2<sup>2</sup> containing 15 assays, the linear effect of the soursop concentration was significant on Q<sub>P</sub>, with R<sup>2</sup> equal to 0.66945. The critical values of soursop concentration (16.55% w/v) and initial pH of fermentation (4.86) at 288 h of fermentation provided the optimum value of volumetric productivity of ethanol (0.410 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). In the fermentation of the honey wort in an enlarged laboratory scale, using the previously established critical conditions, a mead containing: maximum cell concentration (7.07 x 10<sup>7</sup> cel.mL<sup>-1</sup>) was obtained; Ethanol (14.1%) and Q<sub>P</sub> (0.385 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). From the evaluation of the effect of hydrated bentonite, activated charcoal and carboxymethylcellulose (CMC), concentrations equal to 0.5, 1.5 and 2.5 g.L<sup>-1</sup>, under the clarification of the mead produced on an enlarged laboratory scale, it was found that, at the end of 360 h, the mead was the one with the addition of CMC (1.5 g.L<sup>-1</sup>), with an increase in transmittance of 10.4 ± 0.5%. It is possible to produce mead using soursop and cowpea extract that can substitute supplements normally used in the production of hydrometer, thus decreasing the costs of the fermentative process and generating a better use of these raw materials.

**Keywords:** Honey, soursop, cowpea, *Saccharomyces*, mead.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAB: Agência de Defesa Agropecuária da Bahia;

ANOVA: *Analysis of variance*;

ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária;

ASBC: *American society of brewing chemists*;

BOD: *Biochemical oxygen demand*;

CAPES: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior;

CAC: *Codex alimentarius comission*;

CMC: Carboximetilcelulose;

COOARP: Cooperativa de apicultores de Ribeira do Pombal;

DN: Número de diástase;

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico;

EMBRAPA: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária;

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz;

HMF: Hidroximetilfurfural;

IBGE: Instituto brasileiro de geografia e estatística;

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

PET: Polietileno tereftalato;

PPGBiotec: Programa de pós-graduação em Biotecnologia;

Q<sub>p</sub>: Produtividade volumétrica de etanol

SEBRAE: Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas;

TSS: Teor de sólidos solúveis;

UEFS: Universidade Estadual de Feira de Santana;

YM: *Yeast extract – peptone – malt extract – glucose*.

$\gamma_{P/S}$ : Fator de conversão de substrato em produto.

$\epsilon_f$ : Eficiência fermentativa.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fruto da gravioleira (graviola).....	26
Figura 2: Unidades de D-glicose unidas por ligações $\beta$ -1,4, compondo uma porção mínima da celulose.....	28
Figura 3: Estrutura da pectina.....	28
Figura 4: Variedades de feijão-caupi das subclasses branco-liso (A) e preto-fosco (B), e das subclasses cores mulato-liso (C) e rajado (D). ....	30
Figura 5: Seqüência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	36
Figura 6: Escala de produção de sulfeto de hidrogênio por cepas de <i>S. cerevisiae</i> médio-produtoras (A), superprodutoras (B), não produtoras (C) e pouco produtoras (D) de sulfeto de hidrogênio.....	37
Figura 7: Embalagem (A) e rótulo com informação nutricional (B) do mel utilizado como suplementos no mosto de mel para a produção de hidromel.....	45
Figura 8: Graviola (A) e feijão-caupi (B) utilizados como suplementos no mosto de mel para a produção de hidromel.....	45
Figura 9: Leveduras utilizadas no teste de produção de sulfeto de hidrogênio, Côte des Blancs (A), Premier Cuvée (B) e Saffbrew Abbaye (C). ....	48
Figura 10: Mostos de mel, suplementados com graviola e extrato de feijão-caupi, recém preparados, referentes aos ensaios de 1 a 4 (A), e de 5 a 8 (B), todos em triplicata. ....	52
Figura 11: Mostos de mel, suplementados com graviola e extrato de feijão caupi, recém preparados, referentes aos ensaios de 9 a 11 e controles 1 a 3 (A), e de 12 a 15 (B), todos em triplicata.....	52
Figura 12: Mosto de mel, suplementado com graviola e extrato de feijão caupi, para fermentação em escala laboratorial ampliada.....	53
Figura 13: Garrafas contendo hidromel em processo de clarificação. ....	55
Figura 14: Garrafas contendo hidroméis centrifugados após término do processo de clarificação.....	55
Figura 15: Colônias de leveduras comerciais Cotê des Blancs (A), Premier Cuvée (B) e Saffbrew Abbaye (C) em placas com o meio sólido para avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio.....	64
Figura 16: Perfis de concentração celular (A) e dos teores de sólidos solúveis totais (B) e de açúcares totais (C), durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi, e os perfis do teor de etanol, em % v/v (B) e g.L <sup>-1</sup> (C), para os mostos com 0 (□), 5 (○) e 30 (Δ) g.L <sup>-1</sup> do mesmo extrato.....	65
Figura 17: Perfis das concentrações de glicose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (□), 5 (■) e 30 (▣) g.L <sup>-1</sup> ; perfis das concentrações de frutose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (○), 5 (●) e 30 (●) g.L <sup>-1</sup> do mesmo extrato; e os perfis das concentrações de sacarose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (Δ), 5 (▲) e 30 (▲) g.L <sup>-1</sup> do referido extrato. ....	67

Figura 18: Perfis das concentrações de glicerol durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi. ....	69
Figura 19: Perfis das velocidades específicas de crescimento celular durante a fermentação mostos de mel suplementados 0 (○), 5 (⊖) e 30 (●) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão-caupi. ....	70
Figura 20: Perfis das velocidades específicas de consumo de substrato (A) e de produção de etanol (B), durante a fermentação mostos de mel suplementados 0 (○), 5 (⊖) e 30 (●) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão-caupi. ....	71
Figura 21: Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A) e da eficiência fermentativa (B) durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi. ....	73
Figura 22: Perfis da produtividade volumétrica de etanol durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi. ....	73
Figura 23: Perfis dos valores de pH nos mostos de mel com pH inicial 3,5 (A) e 6,5 (B), sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). ....	74
Figura 24: Perfis de pH nos mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa(■), (□) e (▣)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)). ....	77
Figura 25: Perfis das concentrações celulares das leveduras nos mostos de mel com pH inicial 3,5 (A) e 6,5 (B), sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). ....	78
Figura 26: Perfis das concentrações celulares das leveduras nos mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (□) e ( )) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)). ....	80
Figura 27: Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares redutores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 3,5, sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L <sup>-1</sup> , de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (3,5) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (⊖), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (⊕)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). ....	82
Figura 28: Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares redutores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 5,0, sem (*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (□) e (▣))	

) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L<sup>-1</sup>, de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (5,0) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (○)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (□), (▢) e (▣)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (Δ))...... 84

Figura 29: Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares redutores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 6,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L<sup>-1</sup>, de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (6,5) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (⊖), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (⊕)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲))...... 86

Figura 30: Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 3,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). ..... 88

Figura 31: Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (▢) e (▣)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)). ..... 89

Figura 32: Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 6,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). ..... 90

Figura 33: Superfície de resposta das produtividades volumétricas de etanol (Q<sub>P</sub>) em função do percentual de graviola e do pH inicial dos mostos de mel, suplementados com graviola, correspondentes aos 15 ensaios do delineamento composto central 2<sup>2</sup>. ..... 97

Figura 34: Perfis dos valores de pH (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▢) do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). ..... 99

Figura 35: Perfis dos valores de concentração celular (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▢) do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola,

do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	100
Figura 36: Perfis do teor de sólidos solúveis totais (■) e de etanol (●), durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A); perfis de teor de sólidos solúveis totais nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣), e perfis do teor de etanol nos ensaios 9 (●), 10 (○) e 11 (⊙) do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	101
Figura 37: Perfis do teor de açúcares redutores totais (■) e da concentração de etanol (●), durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A); perfis de teor de açúcares redutores totais nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣), e perfis da concentração de etanol nos ensaios 9 (●), 10 (○) e 11 (⊙) do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	102
Figura 38: Perfis dos valores do fator de conversão de substrato em produto (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	104
Figura 39: Perfis dos valores da eficiência fermentativa (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	105
Figura 40: Perfis dos valores da produtividade volumétrica de etanol (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B). .....	106
Figura 41: Perfis da intensidade da cor do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L <sup>-1</sup> (■), 1,5 g.L <sup>-1</sup> (■) e 2,5 g.L <sup>-1</sup> (■) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C). .....	107
Figura 42: Perfis da tonalidade do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L <sup>-1</sup> (■), 1,5 g.L <sup>-1</sup> (■) e 2,5 g.L <sup>-1</sup> (■) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C). .....	110
Figura 43: Perfis do percentual da cor amarela do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L <sup>-1</sup> (■), 1,5 g.L <sup>-1</sup> (■) e 2,5 g.L <sup>-1</sup> (■) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C). .....	113
Figura 44: Perfis do percentual de transmitância a 660 nm do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L <sup>-1</sup> (■), 1,5 g.L <sup>-1</sup> (■) e 2,5 g.L <sup>-1</sup> (■) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C). .....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de Pfund para correlação entre a cor do mel e suas respectivas absorbâncias a 635 nm. ....	24
Tabela 2: Relação dos principais suplementos utilizados para a produção de hidroméis em trabalhos de diversos autores. ....	34
Tabela 3: Tratamentos térmicos aplicados em mostos de mel, por diferentes autores. ....	35
Tabela 4: Condições de temperatura e pH utilizadas para a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel. ....	38
Tabela 5: Valores iniciais dos TSS totais dos mostos de mel dos trabalhos de alguns autores. ....	42
Tabela 6: Análises físico-químicas realizadas no mel utilizado para a elaboração dos mostos de mel. ....	46
Tabela 7: Análises físico-químicas realizadas na graviola utilizada para a elaboração dos mostos de mel. ....	46
Tabela 8: Análises físico-químicas realizadas no extrato de feijão caupi, utilizado para a elaboração dos mostos de mel. ....	47
Tabela 9: Matriz experimental dos ensaios do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> , com triplicata do ponto central, para verificação do efeito da concentração da graviola, da fibra deste fruto, e do pH inicial, sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel. ....	50
Tabela 10: Matriz experimental dos ensaios controle (sem adição de graviola) sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel. ....	50
Tabela 11: Matriz experimental dos ensaios complementares, com os valores codificados das variáveis experimentais de entrada, para verificação do efeito da suplementação da graviola, e do pH inicial, sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel. ....	51
Tabela 12: Matriz experimental dos ensaios para verificação do efeito da adição de bentonite, carvão ativado e carboximetilcelulose sobre a clarificação do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada. ....	54
Tabela 13: Propriedades físico-químicas do mel e os valores de referência estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA. ....	59
Tabela 14: Comparação dos parâmetros físico-químicos do mel caracterizado no presente trabalho (marca Flor e Ser) com os reportados nos méis referentes aos trabalhos de outros autores. ....	59
Tabela 15: Propriedades físico-químicas da graviola e os valores de referência estabelecidos pela Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016, do MAPA. ....	61
Tabela 16: Comparação dos parâmetros físico-químicos da graviola, caracterizada no presente trabalho, com os reportados por outros autores. ....	62
Tabela 17: Comparação dos parâmetros físico-químicos do extrato de feijão-caupi (150 g.L <sup>-1</sup> , autoclavado a 121°C, por 15 min), produzido e caracterizado no presente trabalho, com os reportados nos grãos de feijão-caupi. ....	63

Tabela 18: Concentrações de glicose, frutose, sacarose e açúcares totais, em g.L <sup>-1</sup> , nos tempos inicial (0 h) e final (240 h) de fermentação, e os respectivos percentuais de redução dessas concentrações, nos mostos de mel fermentados suplementados com extrato de feijão caupi..	68
Tabela 19: Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais independentes e dependentes (de resposta), para os ensaios 1 a 11 do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com triplicata do ponto central, após 192 h de fermentação. ....	93
Tabela 20: ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as eficiências fermentativas nos mostos de mel após 192 h de fermentação. ....	93
Tabela 21: Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais independentes e dependentes (de resposta), para os ensaios 1 a 11 do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com triplicata do ponto central, após 288 h de fermentação. ....	94
Tabela 22: ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as produtividades volumétricas de etanol nos mostos de mel após 288 h de fermentação. ....	94
Tabela 23: ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as eficiências fermentativas nos mostos de mel após 288 h de fermentação. ....	95
Tabela 24: Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais de entrada e de saída para os ensaios 1 a 15 do delineamento composto central 2 <sup>2</sup> , com triplicata do ponto central, após 288 h de fermentação. ....	96
Tabela 25: ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as produtividades volumétricas de etanol nos mostos de mel após 288 h de fermentação. ....	96
Tabela 26: Valores críticos codificados do percentual de graviola e do pH inicial em relação às produtividades volumétricas de etanol após 288 h fermentação dos mostos de mel suplementados com graviola. ....	98
Tabela 27: Valores e variações da intensidade da cor (I), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L <sup>-1</sup> . ....	108
Tabela 28: Valores e variações da tonalidade (T), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L <sup>-1</sup> . ....	110
Tabela 29: Valores e variações do percentual da cor amarela (%Amarelo), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L <sup>-1</sup> . ....	113
Tabela 30: Valores e variações da transmitância a 660 nm (% Trans660), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L <sup>-1</sup> . ....	116
Tabela 31: Valores experimentais dos parâmetros físico-químicas do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada e clarificado com carboximetilcelulose (1,5 g.L <sup>-1</sup> ), e os respectivos valores de referência para verificação da conformidade da qualidade desta bebida alcoólica, conforme a Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008. ....	118
Tabela 32: Parâmetros físico-químicos do hidromel produzido no presente trabalho, em escala laboratorial ampliada e clarificado com carboximetilcelulose (1,5 g.L <sup>-1</sup> ), e os reportados nos hidroméis finais referentes a trabalhos de outros autores. ....	119

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. MEL.....	21
3.1.1. Aspectos gerais.....	21
3.1.2. Composição.....	22
3.1.2.1. Açúcares totais, redutores e não redutores.....	22
3.1.2.2. Umidade.....	22
3.1.2.3. Proteínas e aminoácidos.....	23
3.1.2.4. Micronutrientes.....	23
3.1.2.5. Cor.....	24
3.1.2.6. Perfil antioxidante.....	24
3.1.3. Análises para a verificação da qualidade do mel.....	25
3.1.3.1. Análises físico-químicas.....	25
3.2. GRAVIOLA.....	25
3.2.1. Aspectos gerais.....	25
3.2.2. Composição.....	26
3.2.2.1. Macronutrientes.....	27
3.2.2.2. Micronutrientes.....	27
3.2.2.3. Fibras.....	28
3.2.3. Análises para a verificação da qualidade da graviola.....	29
3.3. FEIJÃO CAUPI.....	29
3.3.1. Aspectos gerais.....	29
3.3.2. Composição.....	31
3.3.2.1. Macronutrientes.....	31
3.3.2.2. Micronutrientes.....	32
3.3.3. Análises para a verificação da qualidade do feijão-caupi.....	32
3.4. HIDROMEL.....	32
3.4.1. Aspectos gerais.....	32
3.4.2. Suplementação do mosto de mel.....	33



3.4.3.	Tratamento térmico do mosto de mel para a produção de hidromel .....	34
3.4.4.	Fermentação do mosto de mel .....	35
3.4.4.1.	Produção de sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) pelas leveduras.....	37
3.4.4.2.	Condições de pH e temperatura.....	37
3.4.4.3.	Cinética de fermentação .....	39
3.4.5.	Análises para a verificação da qualidade do hidromel .....	40
3.4.5.1.	Análises físico-químicas.....	40
3.4.6.	Composição do mosto de mel e do hidromel .....	41
3.4.6.1.	Etanol, glicerol e ácido acético.....	41
3.4.6.2.	Sólidos solúveis totais e açúcares totais, redutores e não redutores.....	42
3.4.6.3.	Perfil de compostos antioxidantes .....	42
3.4.7.	Clarificação do hidromel .....	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	MATÉRIAS-PRIMAS .....	44
4.1.1.	Obtenção.....	44
4.1.2.	Caracterização físico-química .....	45
4.2.	SELEÇÃO DAS LEVEDURAS.....	47
4.3.	FERMENTAÇÕES DE MOSTO DE MEL PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL.....	48
4.3.1.	Verificação do efeito da suplementação com extrato de feijão caupi .....	48
4.3.2.	Avaliação do efeito da concentração da graviola, da fibra deste fruto e do pH .....	49
4.3.3.	Fermentação em escala laboratorial ampliada.....	52
4.3.4.	Clarificação do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada .....	54
4.3.5.	Determinação das concentrações celulares e dos teores de glicose, frutose, sacarose, etanol, glicerol e ácido acético presentes no mosto de mel durante a fermentação .....	55
4.3.6.	Caracterização físico-química do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada .....	56
4.3.7.	Cinética dos processos fermentativos.....	57
4.3.8.	Tratamento estatístico das variáveis de resposta dos ensaios para verificação do efeito da graviola sobre os mostos de mel em fermentação .....	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	58
5.2.	AVALIAÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO PELAS LEVEDURAS .....	64
5.3.	FERMENTAÇÕES DO MOSTO DE MEL PARA A PRODUÇÃO DE HIDROMEL .....	65
5.3.1.	Verificação do efeito da suplementação com extrato de feijão-caupi.....	65

5.3.1.1. Perfis das concentrações celulares, de açúcares e dos produtos primários e secundários da fermentação.....	65
5.3.1.2. Cinética da fermentação .....	70
5.3.2. Avaliação do efeito da concentração de graviola, da fibra deste fruto e do pH inicial	74
5.3.2.1. Comportamento do pH dos mostos .....	74
5.3.2.2. Perfis das concentrações celulares, concentrações de açúcares e de etanol .....	78
5.3.2.3. Análise estatística dos resultados .....	92
5.3.3. Fermentação em escala laboratorial ampliada.....	98
5.3.3.1. Perfis das concentrações celulares, concentrações de açúcares e dos produtos primários e secundários da fermentação.....	98
5.3.3.2. Clarificação do hidromel trasfegado.....	107
5.3.3.3. Caracterização físico-química do hidromel clarificado.....	118
6. CONCLUSÃO.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas através de materiais que as mesmas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia. Quando o material coletado pelas mesmas é o néctar das flores, o mel produzido é denominado mel floral, já quando o material coletado é proveniente das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre as mesmas, o mel produzido será denominado mel de melato (BRASIL, 2000).

A apicultura é uma das atividades mais antigas do mundo pois, além possuir grande importância na agricultura por ser um dos mais importantes meios de polinização, contribui para a geração de rendas através da produção de diversificados produtos como: mel, geléia real, própolis, cera, pólen e hidromel (FERRAZ, 2015). O Brasil apresenta condições climáticas e vegetação bastante favoráveis à sobrevivência e desenvolvimento de abelhas e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da apicultura. A região Nordeste tem importante destaque na produção de mel no país, porque além de possuir uma das floras mais ricas do mundo (o que é essencial para a adaptação e proliferação das abelhas), o mel produzido na mesma foi avaliado como o mais puro do Brasil, e até mesmo do mundo, por ser produzido por abelhas africanizadas, mais resistentes a doenças, que utilizam como matéria prima as plantas nativas livres de agrotóxico (BAYMA, 2008).

A fruticultura é um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro. Através de uma grande variedade de culturas, produzidas em todo o país e em diversos climas, a fruticultura conquista resultados expressivos e gera oportunidades para os pequenos negócios brasileiros, sendo que o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas de China e Índia, o que mostra a relevância do setor para a economia brasileira (SEBRAE, 2015). A família das Anonáceas é composta por cerca de 75 gêneros e mais de 600 espécies, destacando-se a graviola (*Annona muricata* L.), sendo seu cultivo bastante recente. Diversas outras espécies dentro do gênero *Annona* são encontradas em diferentes regiões brasileiras, nas mais variadas condições edafoclimáticas (SÃO JOSÉ, 2003).

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão de corda ou feijão macassar, é um alimento considerado básico para as populações de baixa renda financeira da região Nordeste brasileira, constituindo também uma das principais bases alimentares do Oeste da África (ONWULIRI; OBU, 2002). Faz parte do grupo das leguminosas amiláceas, as quais possuem cerca de 20 – 30% de proteínas, geralmente ricas

em lisina. São também fontes valiosas de fibras alimentares, assim como vitaminas e minerais, incluindo folato, tiamina e riboflavina (PHILIPS *et al.*, 2003). É considerada como uma das mais importantes sementes comestíveis entre as leguminosas, sendo uma fonte de proteínas e aminoácidos essenciais. Por causa do alto teor proteico e um bom equilíbrio de aminoácidos, essa semente é chamada de “carne do homem pobre” (GUPTA *et al.*, 2014).

O hidromel é uma bebida alcoólica com 4 a 14% v/v de etanol, oriunda da fermentação de mosto de mel diluído em água potável, acrescido ou não de sais e/ou outras fontes de nutrientes (BRASIL, 2008) uma bebida de produção antiga no mundo, porém a mesma ainda ocorre de maneira empírica e artesanal, necessitando assim de pesquisas que contribuam para o aprimoramento e a padronização do seu processo de produção (FERRAZ, 2015; GUPTA; SHARMA, 2009).

Bebidas produzidas a partir do mel, além de muito doces, geralmente apresentam baixa viscosidade. Para minimizar esse problema, bem como visar o estímulo do processo fermentativo e a melhoria do aroma final, ácidos orgânicos e frutas (na forma de sucos, polpas ou em pedaços) podem ser adicionadas como suplementos para contribuir com acidez, com fatores de crescimento essenciais à fermentação e com as características sensoriais (GUPTA; SHARMA, 2009; KOGUCHI; SAIGUSA; TERAMOTO, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida alcoólica através da fermentação do mel com suplemento de graviola (*Annona Muricata* L.) e extrato de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do mel e da graviola, além do perfil proteico e de açúcares do extrato de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp);
- Selecionar uma levedura do gênero *Saccharomyces*, através do teste de produção de sulfeto de hidrogênio;
- Verificar o efeito da concentração de extrato de feijão-caupi como possível fonte de proteínas durante a fermentação do mosto de mel;
- Verificar, através de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, com triplicata do ponto central, o efeito da concentração de graviola, da porção fibrosa deste fruto, e do pH na fermentação de mosto de mel;

- Realizar a fermentação para a produção do hidromel, em escala laboratorial ampliada, utilizando a melhor condição dentre as testadas no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>;
- Clarificar o hidromel produzido em escala laboratorial ampliada;
- Avaliar a qualidade do hidromel produzido, conforme legislação específica, através de caracterização físico-química.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. MEL**

##### **3.1.1. Aspectos gerais**

Conforme a Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA, entende-se como mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores (denominado mel floral) ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas (mel de melato), que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000). Existem dezenas de variedades de mel de abelha, cuja diferenciação é determinada pelas técnicas de preparação, pela flora, ou mesmo pelo lugar ou época de colheita (FRANCO, 2003).

O Brasil possui características bastante favoráveis ao desenvolvimento da apicultura, devido ao clima favorável (predominantemente tropical), floradas nativas com grande potencial para a produção de mel, pólen, própolis e geleia real, além do fato das abelhas possuírem boa adaptação às condições do país: sendo altamente produtivas e tolerantes às principais doenças apícolas. O estado da Bahia, devido às várias formações vegetais características dos biomas da Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado, apresenta um grande potencial para a exploração da atividade apícola, especialmente para a produção do mel (OLIVEIRA; SANTOS, 2014).

Conforme Bayma (2008), o mel produzido na região Nordeste foi avaliado como o mais puro do Brasil (e até mesmo do mundo) por ser procedente de plantas nativas livres de agrotóxico e produzido por abelhas africanizadas que são mais resistentes a doenças, algo que gera impacto positivo para a atividade apícola nesta região.

### 3.1.2. Composição

O mel possui cerca de 80 substâncias diferentes, sendo que os açúcares presentes no mesmo consistem em 95 a 99% do total de sólidos (GUPTA; SHARMA, 2009). Além dos carboidratos, o mel contém quantidades consideráveis de água, resíduos minerais fixos, aminoácidos e proteínas, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos (FERRAZ, 2015). A presença de substâncias com propriedades funcionais, como o  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, compostos fenólicos e flavonoides, faz com que o mel possa ser considerado um suplemento alimentar (MENDES *et al.*, 1998).

#### 3.1.2.1. Açúcares totais, redutores e não redutores

Dentre o conteúdo de açúcares do mel, aqueles ditos redutores (principalmente a glicose e a frutose) predominam na composição do mesmo. De acordo com Peralta e Koblitz (2011), a frutose (27,25 a 44,26%) e a glicose (22,03 a 40,75%) são os açúcares majoritários do mel. A proporção destes açúcares é importante para as características físico-químicas do mel, visto que quanto maior o teor de glicose, especialmente na forma monoidratada, maior será a tendência do mel em sofrer cristalização (PERALTA; KOBLITZ, 2011).

Os açúcares não redutores estão presentes no mel em quantidade muito menor do que os redutores e, dentre estes, a sacarose é o predominante, podendo alcançar até 7,57% do conteúdo total do mel, sendo que esse percentual deste açúcar é o remanescente após a ação da enzima invertase sobre néctar, que possui cerca de 75% de sua sacarose inicial convertida em glicose e frutose através da ação da enzima (PERALTA; KOBLITZ, 2011).

Alguns autores, em seus estudos, avaliaram a concentração de açúcares redutores e não redutores em diferentes tipos de méis regionais. Gupta e Sharma (2009) reportaram valores de 68,8 a 80% de açúcares redutores na composição de 13 méis monoflorais da Índia enquanto que, nos mesmos méis, foram encontradas quantidades muito inferiores de açúcares não redutores (0,02 a 3,14%). Campos *et. al.* (2003) avaliaram 25 diferentes amostras de méis, 14 florais e 11 de melato, e encontraram cerca de 55,73 a 73,67% de açúcares totais nos méis analisados.

#### 3.1.2.2. Umidade

Segundo Gupta e Sharma (2009), a umidade (ou conteúdo de água) é o segundo componente majoritário do mel, correspondendo a cerca de 17,2% do conteúdo total do mel.

Nos méis descritos pelos mesmos autores, todos monoflorais e oriundos da Índia, a umidade variou de 17% até 27% (GUPTA; SHARMA, 2009).

A umidade é um dos parâmetros mais importantes no mel no que diz respeito a influência que a mesma exerce em algumas propriedades como a viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização e sabor (SEEMANN; NEIRA, 1988), podendo ser um indicativo do e umidade pode ser um indicativo do estado de maturação do mel, visto que méis em estado ótimo de maturação apresentam, geralmente, umidade inferior a 18,5% (PERALTA; KOBLITZ, 2011).

#### 3.1.2.3. Proteínas e aminoácidos

É consenso para diversos autores que as proteínas constituem os componentes com a terceira maior concentração dentre os presentes no mel. Gupta e Sharma (2009) ressaltam que sua concentração é muito baixa comparada aos teores de açúcares e umidade no mel, e Peralta e Koblitz (2011) afirmam que as proteínas presentes neste produto alimentício podem apresentar origem tanto vegetal (néctar e pólen) quanto animal (abelhas).

Os aminoácidos, unidades mínimas componentes da proteínas e polipeptídios, estão presentes em sua forma livre no mel pela hidrólise das proteínas, sendo que a presença dos mesmos no mel, conforme Peralta e Koblitz (2011), deve-se mais às abelhas do que às plantas que as mesmas utilizam para coletar o néctar para a produção do mel. Dentre os aminoácidos encontrados no mel, a prolina é o que está presente em maior quantidade, representando cerca de 50-85% do total (ANACLETO; MARCHINI, 2004).

#### 3.1.2.4. Micronutrientes

O mel possui como micronutrientes os minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, dentre outros. Os minerais estão presentes em concentrações que variam de 0,02 a 1%, e os mesmos contribuem para a cor deste produto alimentício, visto que geralmente quanto menor o teor de minerais, mais claro será o mel (PERALTA; KOBLITZ, 2011).

O mel contém uma quantidade apreciável de ácido ascórbico (vitamina C), mais especificamente de 16,0 a 34,0 mg.kg<sup>-1</sup>, e de pequenas quantidades das vitaminas do complexo B como a Tiamina (0,04 a 0,2 mg.kg<sup>-1</sup>), Riboflavina (0,1 a 0,6 mg.kg<sup>-1</sup>), Ácido Nicotínico (1,1 a 9,8 mg.kg<sup>-1</sup>), Piridoxina (0,08 a 3,2 mg.kg<sup>-1</sup>), Cianocobalamina (0,03 a 0,04 mg.kg<sup>-1</sup>) e Ácido Pantoténico (0,2 a 1,1 mg.kg<sup>-1</sup>) (FATTORI, 2004; HORN, 1996)

### 3.1.2.5. Cor

A cor do mel depende de vários fatores como a pureza do mel, variações no clima durante o fluxo do néctar, temperatura de amadurecimento na colmeia, processamento, exposição à luz, tempo de estocagem e possíveis reações entre os componentes presentes no mel (PERALTA; KOBLITZ, 2011).

A cor do mel, conforme Bianchi (1981), pode variar desde o branco-água até o âmbar escuro. O que determina a intensidade da cor do mel (em mm) é a absorvância do mesmo, a um comprimento de onda de 635 nm, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Escala de Pfund para correlação entre a cor do mel e suas respectivas absorvâncias a 635 nm.

Mel	Cor (mm)	Absorvância (635 nm)
Branco-água	0 a 7,9	0,104 a 0,124
Extrabranco	8 a 16,4	0,125 a 0,147
Branco	16,5 a 33,9	0,148 a 0,194
Âmbar extraclaro	34 a 49,9	0,195 a 0,237
Âmbar claro	50 a 84,9	0,238 a 0,332
Âmbar	85 a 113,9	0,333 a 0,410
Âmbar escuro	114 ou mais	0,411 ou mais

Fonte: Adaptado de Bianchi (1981).

Para a elaboração de produtos fermentados como, por exemplo, hidroméis, os méis escuros são indesejáveis devido ao forte (e desagradável) aroma que proporcionam a essas bebidas durante e após a fermentação (JOSHI; SHANDU; THAKUR, 1999). Sendo assim, para a elaboração de hidroméis e vinhos de mel, geralmente são indicados méis com coloração castanho-amarelada (GUPTA; SHARMA, 2009).

### 3.1.2.6. Perfil antioxidante

O mel pode ser considerado uma fonte natural de substâncias antioxidantes e, assim, pode auxiliar na prevenção de doenças causadas por radicais livres (DŽUGAN *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos, tais como os flavonoides e os ácidos fenólicos, são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante do mel, sendo que, conforme Tsiapara *et al.* (2009), mais de 150 destes compostos tem sido verificados em méis.

Estas substâncias são consideradas termoestáveis, ou seja, resistentes a elevadas temperaturas (ELBANNA *et al.*, 2014) e estão significativamente correlacionados à cor dos méis, já que méis escuros possuem maiores teores de compostos fenólicos e,



consequentemente, maior atividade antioxidante (BERTONCELI *et al.*, 2007; WESOŁOWSKA; DŽUGAN, 2016).

Conforme Džugan *et al.* (2018), não existem métodos oficiais para avaliar a atividade antioxidante do mel e, assim, os métodos geralmente utilizados com essa finalidade não são ideais, pois cada um permite a medição de um grupo diferente de antioxidantes. Então, a partir disto, subentende-se que o(s) método(s) escolhido(s) para a avaliação da atividade antioxidante do mel dependem de quais compostos deseja-se detectar e quantificar preferencialmente.

### 3.1.3. Análises para a verificação da qualidade do mel

A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 estabelece as análises físico-químicas necessárias para a avaliação da qualidade do mel (BRASIL, 2000). No tocante às análises microbiológicas necessárias para a garantia da inocuidade do mel em relação aos consumidores, a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA, estabelece padrões microbiológicos para produtos açucarados, similares ao mel (BRASIL, 2001).

#### 3.1.3.1. Análises físico-químicas

Conforme Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, MAPA, as análises físico-químicas exigidas para a verificação da qualidade do mel comercializado no Brasil são: teor de açúcares redutores, em g /100 g (% m/m); sacarose aparente (% m/m); sólidos insolúveis em água (% m/m); minerais ou cinzas (% m/m); acidez máxima ( $\text{mEq.kg}^{-1}$ ); atividade diastásica (escala de Göthe); e hidroximetilfurfural, em  $\text{mg.kg}^{-1}$  (ppm) (BRASIL, 2000).

## 3.2. GRAVIOLA

### 3.2.1. Aspectos gerais

A gravioleira (*Annona muricata* L.), é uma espécie vegetal pertencente à família *Annonaceae*, que compreende aproximadamente 130 gêneros e 2300 espécies (MISHRA *et al.*; 2013). A gravioleira é nativa das regiões mais quentes da América, sendo amplamente distribuída nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo países como Índia, Malásia e Nigéria (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2006).

No Brasil, os estados com maior produção de graviola são Bahia e São Paulo (SOBRINHO, 2010). De acordo com Lemos (2014), no ano de 2012, a Agência de Defesa

Agropecuária da Bahia (ADAB) estimou que a produção deste fruto no estado da Bahia ficou entre 19 a 20 mil toneladas de fruto, equivalendo a uma receita variante entre 25 e 35 milhões de reais, números que, segundo o autor, podem ser considerados bastante representativos para uma atividade comercial recente.

Os frutos da gravioleira podem chegar a pesar mais de oito quilogramas (SOBRINHO, 2010) e, de acordo com Lima *et al.* (2004), as características mais distinguíveis da graviola, além do formato, são a casca fina, de cor verde escura, e a polpa branca (Figura 1), de sabor ácido e aroma característico. Outro fato marcante é o elevado percentual de polpa que este fruto possui, alcançando percentuais superiores a 83% m/m de polpa em relação à massa total do fruto (SACRAMENTO *et al.*, 2013).

**Figura 1:** Fruto da gravioleira (graviola).



**Fonte:** Nunes (2011).

### 3.2.2. Composição

A graviola é rica em água e possui teores de carboidratos, fibras, proteínas, cinzas, cálcio e magnésio superiores a muitos frutos (LIMA *et al.*, 2011). Além dos nutrientes mencionados anteriormente, a graviola é uma boa fonte de ácido fólico, fósforo, ferro, vitamina C e grandes quantidades de vitaminas B1 e B2 (DEMBITSKY *et al.*, 2011).

Além de ser um fruto nutritivo, a graviola é fonte de componentes com propriedades terapêuticas, sendo reportadas, tanto nos frutos quanto nas folhas e sementes da gravioleira, a presença de substâncias com atividades biológicas terapêuticas contra doenças como artrite reumatoide, câncer, diabetes, dislipidemias, inflamações, hipertensão arterial, verminoses, dentre outras (MOGHADAMTOUS *et al.*, 2015).

### 3.2.2.1. Macronutrientes

A água (82,2%), os carboidratos (15,8%) e as fibras (1,9%) são os componentes presentes em maior quantidade na graviola (LIMA *et al.*, 2011) de acordo com as análises de diferentes variedades deste fruto, sob a forma de polpa e/ou néctar, realizadas por Anaya-Esparza *et al.* (2018) e Siqueira *et al.* (2015). Foram encontrados teores de carboidratos entre 11,41 e 14,71% m/m em cinco variedades brasileiras de graviola, conforme Siqueira *et al.* (2015), enquanto que foram encontrados teores de açúcares solúveis entre 97,5 e 101,0 g.L<sup>-1</sup> (9,75 a 10,1% m/v) em néctares de variedades mexicanas de graviolas (ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2018), sugerindo assim que tanto a polpa *in natura* quanto o néctar deste fruto são ricos em açúcares.

No tocante às proteínas, podem ser encontradas na graviola *in natura* em teores próximos a 0,8% m/m (LIMA *et al.*, 2011) alcançando teores um pouco superior a 1% m/m (SIQUEIRA *et al.*, 2015), enquanto que no néctar, o teor proteico pode atingir valores próximos a 3,0 g.L<sup>-1</sup> (0,3% m/v), indicando assim que o fruto *in natura* é uma fonte melhor de proteínas do que o néctar ou mesmo outras formas de disponibilização da graviola.

### 3.2.2.2. Micronutrientes

Dentre os micronutrientes presentes na graviola, a mesma é considerada uma boa fonte de antioxidantes naturais, sendo que todas as partes deste fruto são utilizadas pela medicina popular tradicional (BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007). No tocante aos teores de compostos antioxidantes (sobretudo compostos fenólicos e flavonoides, foram reportados valores entre 154,40 e 358,92 mg de ácido gálico/100 g de graviola (ou seja, entre 1554,0 e 3589,2 ppm), indicando que os teores podem variar bastante dependendo da variedade do fruto bem como as condições morfoclimáticas dos locais onde as gravioleiras são cultivadas (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Num estudo realizado por outros autores, foram quantificadas elevadas concentrações de flavonoides (574 mEq/100 g) e polifenóis (941,4 mEGA/100 g) em extratos etanólicos de polpa de graviola, indicando que esses componentes podem ser obtidos facilmente a partir deste fruto através da extração utilizando etanol como solvente (VIT; SANTIAGO; PÉREZ-PÉREZ, 2014).

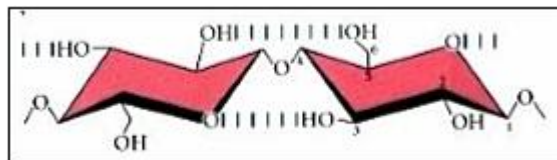
A presença de minerais como potássio, cálcio, sódio, cobre, ferro e magnésio na graviola faz com que o consumo regular deste fruto proporcione nutrientes e elementos essenciais ao corpo humano (GYAMFI *et al.*, 2011). A polpa de graviola *in natura* apresenta cerca de 1,0% m/m de cinzas minerais, sendo que predominam os conteúdos de potássio

(0,250% m/m), cálcio (0,040% m/m), magnésio (0,023%) e fósforo (0,019%), principalmente (LIMA *et al.*, 2011).

### 3.2.2.3. Fibras

As fibras são classificadas como solúveis ou fibras fermentáveis no cólon, e as fibras insolúveis que têm ação espessante, mas que só podem ser fermentadas numa extensão limitada no cólon (OLIVEIRA, 2012). As fibras insolúveis geralmente são ricas em celulose que é um polímero formado por inúmeras unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (ver Figura 2) e é insolúvel em água, não sendo naturalmente digerida pelos mamíferos, visto que, os mesmos não possuem em seu sistema digestório enzimas capazes de hidrolisar este polissacarídeo (KOBLOITZ, 2008; NELSON; FOX, 2014).

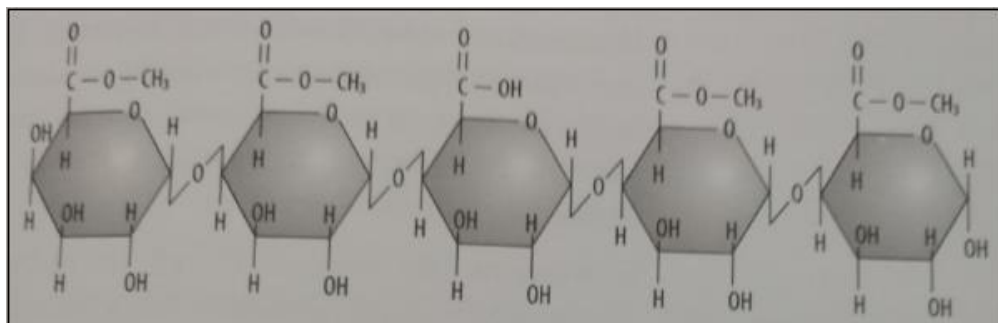
**Figura 2:** Unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4, compondo uma porção mínima da celulose.



**Fonte:** Adaptado de Nelson e Fox (2014).

As fibras solúveis são constituídas, dentre outros componentes, de pectina que são substâncias pécnicas que contém 75%, ou mais, de ácidos galacturônicos esterificados com etanol (Figura 3), e são capazes de formar géis em meio ácido e na presença de açúcar (KOBLOITZ, 2008).

**Figura 3:** Estrutura da pectina.



**Fonte:** Adaptado de Koblitz (2008).

A graviola possui alto percentual de fibras, especialmente insolúveis. O conteúdo médio de fibras da graviola *in natura* é aproximadamente 1,9% m/m de fibra alimentar,

porém, conforme estudos realizados por Siqueira *et al.* (2015), esse teor pode apresentar valores bem maiores (entre 3,72 e 5,69% m/m), predominando o percentual de fibras insolúveis (2,78 a 4,46% m/m) em relação ao de fibras solúveis (0,94% a 1,84% m/m) (LIMA *et al.*, 2011).

### 3.2.3. Análises para a verificação da qualidade da graviola

De acordo com a legislação brasileira, os padrões de qualidade da polpa ou purê de graviola são estabelecidos pela Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece os padrões organolépticos (cor, aroma e sabor) e físico-químicos deste e de muitos frutos. Os padrões microbiológicos da graviola são definidos pela RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

As análises físico-químicas que devem ser realizadas na polpa de graviola, conforme a Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016, do MAPA, são as seguintes: teor de sólidos solúveis (TSS) totais, em °Brix; teor de sólidos totais, em g/100g (% m/m); potencial hidrogeniônico (pH); acidez total, em % m/m de ácido cítrico; açúcares totais, em % m/m; e ácido ascórbico (vitamina C) em % m/m (BRASIL, 2016).

Além das análises exigidas pela legislação mencionada é viável a análise do teor de compostos fenólicos totais e de fibras (BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007; LIMA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2015) já que os mesmos podem influenciar nas características físico-químicas e organolépticas de produtos elaborados utilizando a graviola como suplemento.

## 3.3. FEIJÃO CAUPI

### 3.3.1. Aspectos gerais

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), também conhecido como feijão-macassa, feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-da-colônia, feijão-de-estrada e feijão-miúdo (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983), é uma leguminosa de origem africana, a qual foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no Estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). Esta leguminosa é cultivada e consumida em todas as regiões do Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, enquanto que nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, provavelmente por questões climáticas, a produção e o consumo

do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) predominam, visto que o feijão-caupi é mais adaptado às condições tropicais e subtropicais do que o feijão-comum (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; SINGH, 2006).

Existem várias variedades de feijão-caupi que, quanto à cor, são classificados em quatro classes: branco, contendo cinco (5) subclasses com o mínimo de 90% de grãos com tegumento de coloração branca; preto, apresentando duas (2) subclasses com o mínimo de 90% de grãos com tegumento de coloração preta, podendo ser fosco ou apresentar brilho; cores, compreendendo dez (10) subclasses com o mínimo de 90% de grãos da Classe Cores, admitindo-se até 10% de outros cultivares da Classe Cores que apresentem contraste na cor ou no tamanho; e misturado, produto que possui grãos de diferentes classes e que não atende às especificações de nenhuma das classes anteriores (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

A Figura 4, a seguir, apresenta exemplos de feijões-caupi das classes mencionadas anteriormente.

**Figura 4:** Variedades de feijão-caupi das subclasses branco-liso (A) e preto-fosco (B), e das subclasses cores mulato-liso (C) e rajado (D).



**Fonte:** Adaptado de Freire Filho *et al.* (2011).

O feijão-caupi tem uma grande importância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda nas localidades onde o seu cultivo é realizado. (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Conforme levantamentos realizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no período de 2005 a 2009, constata-se que, na média desse período, numa

área cultivada de 1.391.386 hectares, foram produzidas 513.619 toneladas de feijão-caupi (LEVANTAMENTO, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009). E, nesse período de tempo, a cultura do feijão caupi gerou, em média, 1.113.109 empregos por ano, constituiu um suprimento alimentar para 28.205.327 pessoas e gerou uma produção anual no valor de R\$ 684.825.333 (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Composição

O feijão-caupi é rico em proteínas, minerais e fibras (FROTA *et al.*, 2008; SINGH, 2007) além de carboidratos sob a forma de amido oligossacarídeos indigeríveis como a rafinose, estaquiose e verbascose (MOREIRA *et al.*, 2008). O feijão-caupi, assim como muitas leguminosas, constitui uma fonte valiosa de fibra dietética bem como de minerais, vitaminas, folato, tiamina e riboflavina (MOREIRA *et al.*, 2008).

#### 3.3.2.1. Macronutrientes

Os nutrientes que estão presentes em maior quantidade no feijão-caupi são os carboidratos, as proteínas e a água (SOUZA-SILVA *et al.*, 2002). Os mesmos autores reportaram a composição de 45 diferentes genótipos desta leguminosa e os teores de carboidratos variaram 26,10 a 74,51% m/m, enquanto que os teores de proteínas variaram de 20,29 a 29,29% m/m, e os de umidade entre 9,74 e 15,34% m/m (SOUZA-SILVA *et al.*, 2002). Esses resultados demonstram que os teores, principalmente os carboidratos, no feijão-caupi variam dependendo do genótipo desta leguminosa.

O conteúdo proteico do feijão-caupi é comparável é próximo de outras leguminosas como o grão-de-bico (24,0% m/m), lentilha (26,0% m/m) e ervilha (24,9% m/m) (FARZANA; KHALIL, 1999). O feijão-caupi possui um perfil aminoácidos típico das leguminosas, ricas em lisina e com baixas concentrações de aminoácidos sulfurados (MOREIRA *et al.*, 2008).

No feijão-caupi, predominam os seguintes aminoácidos: ácido glutâmico (17,2% m/m), ácido aspártico (10,2% m/m), a leucina (7,7% m/m), a arginina (7,5% m/m) e a lisina (7,5% m/m). Estes aminoácidos também são os predominantes no grão-de-bico, na lentilha e na ervilha (IQBAL; KHALIL; SHAH, 2003). O feijão-caupi não contém glúten (FU *et al.*, 1996), portanto pode ser ingerido por portadores da doença celíaca.

O feijão-caupi possui um teor médio de lipídios (4,8% m/m) próximo ao do grão-de-bico, aproximadamente 5,2% m/m (FARZANA; KHALIL, 1999). No tocante ao perfil de ácidos graxos, Castellón *et al.* (2003) avaliaram os teores de 8 ésteres (um deles não

identificado) oriundos de ácidos graxos em 6 cultivares diferentes de feijão-caupi, e os mesmos autores verificaram que o hexadecanoato (que é derivado do ácido palmítico) predomina consideravelmente em relação aos demais ésteres derivados de ácidos graxos que compõem o perfil lipídico desta leguminosa.

#### 3.3.2.2. Micronutrientes

O feijão-caupi contém cerca de 4,2% m/m de cinzas, percentual superior aos de outras leguminosas como o grão-de-bico (3,6% m/m), a ervilha (3,6% m/m) e a lentilha (2,8% m/m) (FARZANA; KHALIL, 1999). Porém, o teor de cinzas pode variar bastante dependendo do genótipo e da variedade visto que Souza-Silva *et al.* (2002) reportaram teores variando de 1,09 a 4,14% m/m em 45 diferentes genótipos de feijão-caupi.

Os teores individuais de minerais que estão presentes em maior quantidade no feijão-caupi são o potássio (1,280% m/m), fósforo (0,303% m/m), cálcio (0,176% m/m) e sódio (0,102%) (IQBAL *et al.*, 2006). Estes minerais também são predominantes no grão-de-bico, na lentilha e na ervilha (IQBAL *et al.*, 2006).

#### 3.3.3. Análises para a verificação da qualidade do feijão-caupi

Não existe uma legislação brasileira que determine os padrões físico-químicos para avaliar a qualidade do feijão-caupi. A Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008, do MAPA, estabelece o regulamento técnico tanto do feijão-caupi quanto do feijão comum e detalha critérios de seleção e classificação dos grãos dessas leguminosas (BRASIL, 2008a).

No que tange à composição química, de acordo com a norma supracitada, os grãos de feijão devem estar isentos de substâncias nocivas à saúde, ou seja, substâncias ou agentes estranhos de origem biológica, química ou física que sejam nocivos à saúde, tais como as micotoxinas, os resíduos de produtos fitossanitários ou outros contaminantes, previstos em legislação específica vigente (BRASIL, 2008a). Portanto, a análise de micotoxinas e de contaminantes químicos como, por exemplo, agrotóxicos pode ser útil para atestar a qualidade do feijão-caupi.

### 3.4. HIDROMEL

#### 3.4.1. Aspectos gerais

O hidromel, bebida oriunda da fermentação alcoólica do mel diluído em água, provavelmente a bebida fermentada mais antiga a ser produzida no mundo, visto que evidências arqueológicas sugerem que por volta do ano 7000 a.C. já era produzida e



consumida no norte da China (GUPTA; SHARMA, 2009). Polpa ou pedaços de frutas, ácido cítrico, ervas e especiarias podem ser utilizadas como suplementos no processo de preparo do hidromel (FERRAZ, 2015).

O hidromel é um produto secundário dentro da atividade apícola, de importância econômica relevante, considerando os valores alcançados por este produto. Em 2015, segundo Ferraz (2015), no mercado nacional, uma garrafa de 750 mL chega a custar R\$ 50,00, evidenciando uma atividade economicamente viável para o apicultor.

A produção de hidromel ainda ocorre de maneira empírica e artesanal, o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que visem o aprimoramento de processo de fabricação, considerando desde a seleção do agente da fermentação, formulação do mosto, estudo dos parâmetros fermentativos, bem como a definição de padrões de identidade e qualidade do produto final (FERRAZ, 2015).

#### 3.4.2. Suplementação do mosto de mel

O mel, pode ser classificado em seis níveis colorimétricos: branco-água, branco, âmbar extra leve, âmbar leve, âmbar e âmbar escuro (GUPTA; SHARMA, 2009). Para a produção do hidromel recomenda-se o uso de mel com coloração próxima ao castanho, pelo fato de que o uso de mel com coloração muito escura pode ocasionar a produção de hidroméis com aromas desagradáveis.

Apesar de ser rico em açúcares fermentescíveis, o mel é deficiente em nitrogênio, minerais e fatores de crescimentos necessários ao desenvolvimento das leveduras e à sua atividade fermentativa (GUPTA; SHARMA, 2009). Em função da carência de nutrientes, baixo pH e baixa concentração de minerais, a produção de hidromel demanda um longo tempo de fermentação (GOMES *et al.*, 2013). Por esses motivos, geralmente adicionam-se suplementos ao mel, para corrigir a deficiência destes elementos essenciais para o processo de fermentação alcoólica.

O hidromel pode ser classificado, dependendo dos adjuntos adicionados durante o preparo do mosto do mel, principalmente em: *Meteglin*, que contém ervas ou especiarias; *Melomel*, com sucos de frutas; *Cyser*, com suco de maçã; *Pyment*, com suco de uva; *Hippocras*, que equivale ao hidromel *Pyment* acrescido de ervas e especiarias; *Meade*, que não é um hidromel, mas um vinho acrescido de mel, tendo assim uma certa semelhança com o hidromel; *Sack*, que é um hidromel elaborado com quantidades de mel mais abundantes do que as normalmente utilizadas; e o *Rhodomel*, que contém pétalas de rosas (GUPTA; SHARMA, 2009).

Diversos autores têm realizado estudos aprimoramento e/ou de otimização das condições de fermentação do mosto de mel, para a produção do hidromel, utilizando diferentes concentrações e combinações variadas de diversos tipos de suplementos, tanto naturais (como frutas, temperos, especiarias, etc.) quanto comerciais. A Tabela 2 mostra os suplementos utilizados, por alguns autores, para a produção dos seus respectivos hidroméis.

**Tabela 2:** Relação dos principais suplementos utilizados para a produção de hidroméis em trabalhos de diversos autores.

<b>Autor(es)</b>	<b>Principais suplementos utilizados para a produção do hidromel</b>
<b>Amorim <i>et al.</i> (2018)</b>	Acerola, extrato de malte, extrato de levedura, peptona e sais (cloreto de magnésio, sulfato de amônio e fosfato de amônio bibásico)
<b>Anunciação <i>et al.</i> (2017)</b>	Tamarindo, extrato de malte, extrato de malte, peptona e sais (cloreto de magnésio e sulfato de amônio)
<b>Barrios <i>et al.</i> (2010)</b>	Sais (sulfato de cálcio, fosfato de amônio bibásico, bitartarato de potássio e flor de enxofre, cloreto de sódio metabissulfito de sódio) e ácido tartárico
<b>Czabaj <i>et al.</i> (2017)</b>	Fostato de amônio bibásico
<b>Ferraz (2015)</b>	Sais (sulfato de amônio, fostafo de amônio bibásico e cloreto de magnésio), Enovit® e pedaços de maçã do tipo Gala (lavadas e coladas em 8 partes)
<b>Mascarenhas <i>et al.</i> (2017)</b>	Abacaxi, extrato de malte, extrato de levedura, peptona e sais (cloreto de magnésio e sulfato de amônio)
<b>Mendes-Ferreira <i>et al.</i> (2010)</b>	Tartarato de potássio, ácido málico e fosfato de amônio bibásico
<b>Navrátil, Sturdík e Gemeiner (2001)</b>	Vitamon Ultra salt®
<b>Pereira <i>et al.</i> (2009)</b>	Suplementos 1 (mistura de Enovit® dióxido de enxofre e ácido tartárico) e 2 (mistura de fosfato de amônio monobásico, tartarato de sódio e potássio tetraidratado, sulfato de cálcio, ácido tartárico e bentonite na forma sódica)
<b>Pereira <i>et al.</i> (2014)</b>	Tartarato de potássio e fosfato de amônio bibásico
<b>Pereira <i>et al.</i> (2015)</b>	Sais (fosfato de potássio, sulfato de magnésio e cloreto de cálcio) e vitaminas (inositol, piridoxina, ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, tiamina, riboflavina e biotina)
<b>Roldán <i>et al.</i> (2011)</b>	Pólen comercial obtido da região de Valência, na Espanha
<b>Sroka e Tuzyński (2007)</b>	Fosfato de amônio bibásico e ácido cítrico

**Fonte:** O autor.

### 3.4.3. Tratamento térmico do mosto de mel para a produção de hidromel

O tratamento térmico do mosto de mel antes da introdução do inóculo de leveduras é um procedimento fundamental para eliminar, ou reduzir o máximo possível, a carga

microbiana proveniente das matérias primas componentes do mosto e, assim, prevenir interferências negativas no processo fermentativo.

A Tabela 3 apresenta tratamentos térmicos que alguns autores aplicaram em mostos de mel para a elaboração dos seus respectivos hidroméis, envolvendo desde a aplicação de temperaturas mais brandas, por tempos curtos, até o uso de fervura por tempos prolongados.

**Tabela 3:** Tratamentos térmicos aplicados em mostos de mel, por diferentes autores.

<b>Autor(es)</b>	<b>Tratamento(s) térmico(s) aplicado(s) ao(s) mosto(s) de mel</b>
<b>Czabaj <i>et al.</i> (2017)</b>	Fervura (30 min) ou pasteurização (65°C / 10 min)
<b>Ferraz (2015)</b>	Pasteurização (75°C / 15 min)
<b>Kahoun, Řesková e Královský (2017)</b>	Aquecimentos (40 a 100°C / 60 min)
<b>Mendes-Ferreira <i>et al.</i> (2010)</b>	Pasteurização (65°C / 10 min)
<b>Sroka e Tuzyński (2007)</b>	Fervura (10 min)

**Fonte:** O autor.

Os tratamentos térmicos realizados por Kahoun, Řesková e Královský (2017), como descrito na Tabela 3, objetivaram avaliar os efeitos que os mesmos provocam nos hidroméis no tocante à composição de ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e sobre a atividade antioxidante. Os autores recomendaram que o aquecimento térmico do mosto de mel não fosse realizado por temperaturas acima de 80°C, por 60 minutos, devido ao aparecimento de características indesejáveis nos hidroméis preparados como, por exemplo, o grande aumento da concentração de hidroximetilfurfural ocasionado pelos tratamentos térmicos severos ao mosto de mel.

Além do tratamento térmico do mosto de mel, os componentes do mesmo (mel, água e adjuntos) podem receber o tratamento térmico antes da sua mistura e, assim, o mosto não precisa receber o tratamento térmico após pronto, desde que seja mantido em condições assépticas.

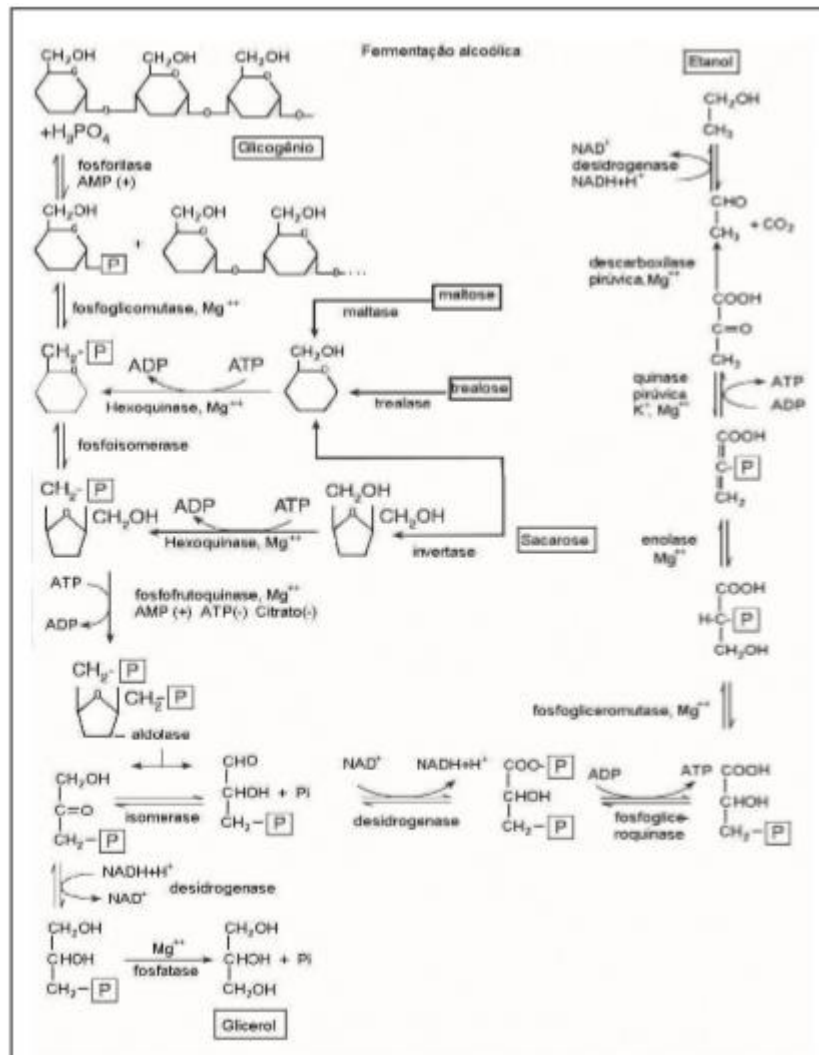
#### 3.4.4. Fermentação do mosto de mel

A fermentação do mosto de mel, pelas leveduras do gênero *Saccharomyces*, consiste na fermentação alcoólica, que é um processo anaeróbico utilizado para a obtenção de ATP pelas células, onde as mesmas utilizam a glicose para a produção de etanol e gás carbônico (CO<sub>2</sub>), como produtos primários, e de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico

e outros, álcoois superiores, dentre outros compostos conhecidos como produtos secundários da fermentação alcoólica (LIMA *et al.*, 2001).

A Figura 5, esquematiza as reações bioquímicas ocorridas no processo de fermentação alcoólica conduzido pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

**Figura 5:** Seqüência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Lima *et al.* (2011).

Conforme a Figura 5, a fermentação alcoólica da aldolase (glicose cíclica) oriunda de carboidratos maiores como o glicogênio, maltose, trealose e sacarose, possui duas vias distintas, sendo que uma conduz à formação do etanol (via principal) e a outra conduz à produção de glicerol, que é o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação e que está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico devido às

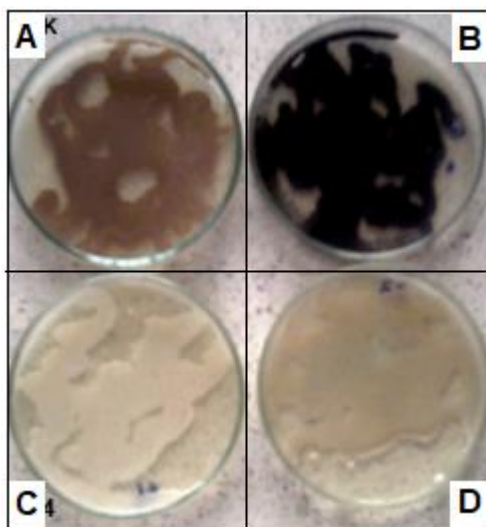
concentrações elevadas de açúcares ou de sais no mosto (CARVALHO; ROSSI; ALMEIDA E SILVA, 2007; LIMA *et al.*, 2001; WALKER, 2000).

#### 3.4.4.1. Produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) pelas leveduras

O sulfeto de hidrogênio é um gás responsável pelo odor característico de ovo podre, sendo produzido por muitas cepas durante a fermentação alcoólica. A presença dessa substância, em grande quantidade, em bebidas pode ocasionar odor e aroma desagradáveis, gerando rejeição por parte dos consumidores (RIBEIRO, HORII, 1999).

As leveduras podem produzir quantidades diferenciadas de sulfeto de hidrogênio que, em meio sólido contendo acetato de chumbo (ONO *et al.*, 1991), escurecem o mesmo proporcionalmente à quantidade de sulfeto de hidrogênio (GUIMARÃES, 2005) conforme pode ser observado na Figura 6.

**Figura 6:** Escala de produção de sulfeto de hidrogênio por cepas de *S. cerevisiae* médio-produtoras (A), superprodutoras (B), não produtoras (C) e pouco produtoras (D) de sulfeto de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de Guimarães (2005).

#### 3.4.4.2. Condições de pH e temperatura

As leveduras, assim como os demais microrganismos, têm faixas ótimas de pH e temperatura para o seu desenvolvimento e sobrevivência e, conseqüentemente, as fermentações conduzidas pelas mesmas devem acontecer dentro dos intervalos ótimos destes parâmetros a fim de que ocorram de maneira eficaz, sem provocar o *stress* das leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2005; LIMA *et al.*, 2001).

As leveduras são mesófilas e, assim, as temperaturas ótimas para a produção de etanol variam de 26 a 35°C, chegando até 38°C em destilarias e, no tocante ao pH, valores entre 4 e 5 desse parâmetro físico-químico são os mais adequados para o desenvolvimento das fermentações, sendo que fermentações em valores mais baixos de pH podem ser realizadas a fim de melhorar o rendimento de etanol devido à restrição do crescimento da população de leveduras, redução da produção de glicerol e, principalmente, devido à redução da contaminação bacteriana (LIMA *et al.*, 2001).

Na Tabela 4 estão descritos valores de temperatura, bem como valores de pH inicial dos mostos de mel e das cepas de leveduras utilizadas para fermentar os respectivos mostos.

**Tabela 4:** Condições de temperatura e pH utilizadas para a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel.

<b>Autor(es)</b>	<b>Cepa de levedura</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH inicial</b>
<b>Amorim <i>et al.</i> (2018)</b>	<i>S.cerevisiae</i> AWRI 796	30	5,0
<b>Gomes <i>et al.</i> (2013)</b>	<i>S. cerevisiae</i> ph.r. <i>bayanus</i> PB2002	20, 25 e 30	3,5
<b>Ilha <i>et al.</i> (2008)</b>	<i>S.cerevisiae</i>	25	4,5
<b>Pereira <i>et al.</i> (2013)</b>	<i>S. cerevisiae</i> (Lalvin QA23 e Lalvin ICV D47)	22	3,7
<b>Pereira <i>et al.</i> (2014)</b>	<i>S. cerevisiae</i> (Lalvin QA23 e Lalvin ICV D47)	25	3,7
<b>Roldán <i>et al.</i> (2011)</b>	<i>S. cerevisiae</i> , (ENSIS- LE5®)	25	3,6

**Fonte:** O autor.

Para ajustar o pH do mosto de mel é desejável utilizar substâncias que não sejam prejudiciais ao organismo, visto que o hidromel é um produto destinado para consumo humano. Para acidificar o mosto no início da fermentação, Pereira *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2014) utilizaram ácido málico, enquanto que Gomes *et al.* (2013) e Roldán *et al.* (2011) utilizaram ácido tartárico, enquanto que, para alcalinizar o mosto de mel, Amorim *et al.* (2018) utilizaram carbonato de cálcio.

A fermentação de mostos de mel em valores de pH próximos do neutro (7,0) podem favorecer o desenvolvimento de bactérias caso o mosto, e/ou seus componentes, não tenham sido corretamente pasteurizados ou esterilizados, ou mesmo se o preparo do mesmo não correu de forma asséptica. Segundo Franco e Landgraf (2005), a faixa de pH entre 6,5 e 7,5 é a mais favorável para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos.

#### 3.4.4.3. Cinética de fermentação

A cinética de um processo fermentativo consiste inicialmente da análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação, sendo esses componentes os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura, microrganismo (ou biomassa) e os produtos do metabolismo, ou metabólitos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O crescimento (ou decréscimo) da população de células de leveduras, o consumo dos substratos e a formação dos produtos durante o processo fermentativo são quantificados em termos de velocidades instantâneas e específicas. A velocidade instantânea de um determinado componente equivale à primeira derivada da variação da concentração do mesmo em função do tempo de fermentação. As equações 1 a 3, a seguir, evidenciam como são calculadas as velocidades instantâneas do crescimento celular ( $r_X$ ), do consumo de substrato ( $r_S$ ) e da formação do produto ( $r_P$ ), sendo X, S, P as concentrações de células, substrato e produto (dadas em  $g.L^{-1}$ ), respectivamente, e t (em h) equivale ao tempo de fermentação.

$$r_X = dX/dt \quad (\text{eq. 1})$$

$$r_S = -dS/dt \quad (\text{eq. 2})$$

$$r_P = dP/dt \quad (\text{eq. 3})$$

A velocidade específica da concentração de determinado componente equivale à razão entre a sua velocidade instantânea (dada em  $g.L.h^{-1}$ ) e a concentração celular (em  $g.L^{-1}$ ) num determinado instante de tempo. As equações 4, 5 e 6, a seguir, foram utilizadas para o cálculo das velocidades específicas do crescimento celular ( $\mu_X$ ), do consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e da formação do produto ( $\mu_P$ ), respectivamente.

$$\mu_X = (1/X) \times (dX/dt) \quad (\text{eq. 4})$$

$$\mu_S = (1/X) \times (-dS/dt) \quad (\text{eq. 5})$$

$$\mu_P = (1/X) \times (dP/dt) \quad (\text{eq. 6})$$

Outros parâmetros de transformação importantes no estudo cinético de um processo fermentativo são os fatores de conversão que, segundo Lima *et al.* (2001), correlacionam os valores de X, P e S entre si num determinado instante de tempo, tomando como base os valores desses parâmetros no início da fermentação ( $X_0$ ,  $P_0$  e  $S_0$ ). Sendo assim, os fatores de conversão mesmos determinam a formação ou consumo de um determinado componente em relação à formação ou consumo de outro componente.

Os fatores de conversão de substrato em células ( $\gamma_{X/S}$ , dado em  $g_X.g_S^{-1}$ ), de células em produto ( $\gamma_{P/X}$ , dado em  $g_P.g_X^{-1}$ ) e de substrato em produto ( $\gamma_{P/S}$ , dado em  $g_P.g_S^{-1}$ ) são calculados de acordo com as equações 7, 8 e 9, a seguir.

$$\gamma_{X/S} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (\text{eq. 7})$$

$$\gamma_{P/X} = (P - P_0) / (X - X_0) \quad (\text{eq. 8})$$

$$\gamma_{P/S} = (P - P_0) / (S_0 - S) \quad (\text{eq. 9})$$

A eficiência do processo fermentativo ( $\epsilon_f$ ) no que se refere à produção de etanol equivale à razão, expressa em percentual, entre o  $\gamma_{P/S}$  experimental e o  $\gamma_{P/S}$  teórico determinado por Gay-Lussac, ou seja, 0,511  $g_P.g_S^{-1}$  (JACKMAN, 1991). Já, a produtividade volumétrica de etanol equivale à razão entre a concentração de etanol ( $g.L^{-1}$ ) e o tempo de fermentação (h), sendo assim expresso em  $g.L^{-1}.h^{-1}$  (ILHA *et al.*, 2008).

### 3.4.5. Análises para a verificação da qualidade do hidromel

#### 3.4.5.1. Análises físico-químicas

A Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008 (BRASIL, 2008b), determina que as análises físico-químicas que devem ser realizadas para verificar a qualidade do hidromel de acordo com os padrões de identidade e qualidade determinados pelo regulamento técnico presente nesta mesma norma são as seguintes: teor de etanol (%v/v); acidez total e fixa ( $mEq.L^{-1}$ ); acidez volátil ( $mEq.L^{-1}$ , em termos de ácido acético); e extrato seco reduzido ( $g.L^{-1}$ ).

A verificação de outros parâmetros como a cor, turbidez, gravidade específica e até mesmo a quantificação individual de substâncias como álcoois secundários, ésteres, compostos fenólicos, dentre outros, costumam ser realizadas pelos autores nos hidroméis



produzidos em seus trabalhos (bem como nos mostos de mel durante o processo de fermentação).

As análises de cor e turbidez são úteis na avaliação da eficácia da clarificação dos hidroméis seja por processos físicos, seja pela adição de agentes clarificantes ao mosto de mel ou ao próprio hidromel. Amorim (2017) avaliou parâmetros como a intensidade da cor, tonalidade e percentuais da cor amarela e de transmitância para verificar o efeito clarificante da bentonite sobre os hidroméis oriundos de mostos de mel suplementados com diferentes concentrações de acerola (*Malpighia emarginata* DC). Ukpabi (2006) também realizou análises de cor e turbidez em hidromel produzido a partir do mel floral de mandioca (*Manihot esculenta*) e filtrado em tecido de musselina.

Análises de compostos voláteis, como ésteres, ácidos orgânicos e álcoois, são realizadas geralmente quando deseja-se conhecer os componentes, e as quantidades dos mesmos, responsáveis por características diferenciadas, desejáveis ou não, de aroma e sabor na bebida elaborada. Sroka e Tuszyński (2007) avaliaram o perfil de ácidos orgânicos, alguns deles voláteis, durante a fermentação alcoólica de mostos de méis, que também foi avaliado por Mendes-Ferreira *et al.* (2010) que, quantificaram também os teores de ésteres presentes nos mesmos.

#### 3.4.6. Composição do mosto de mel e do hidromel

##### 3.4.6.1. Etanol, glicerol e ácido acético

O etanol é um produto primário da fermentação da glicose, e a sua concentração no hidromel geralmente varia de 8-9 a 18% v/v (SROKA; TUZYŃSKI, 2007; IGLESIAS *et al.*, 2014), e, para esta bebida ser comercializada no Brasil, a graduação alcoólica deve variar de 4 a 14% v/v de etanol (BRASIL, 2008b).

O ácido acético e o glicerol são produtos secundários da fermentação alcoólica. A legislação brasileira que determina o regulamento técnico do hidromel delimita que o teor de ácido acético, mais especificamente como indicativo da acidez volátil, deve ser no máximo 20 mEq.L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2008b).

A mesma legislação não determina os teores máximos e mínimos de glicerol no hidromel, mas Czabaj *et al.* (2017) afirmam que concentrações desse componente superiores a 6 g.L<sup>-1</sup> proporcionam um aumento da viscosidade geral da bebida, o que pode vir a ser indesejável.

### 3.4.6.2. Sólidos solúveis totais e açúcares totais, redutores e não redutores

Os conteúdos de sólidos solúveis totais, bem como o perfil de açúcares, são reduzidos durante a fermentação alcoólica do mosto, visto que as leveduras utilizam os açúcares prontamente fermentescíveis para a formação de etanol (LIMA *et al.*, 2001).

Alguns autores ajustam o teor de sólidos solúveis totais (TSS) dos mostos de mel em valores fixos com o intuito de comparar os efeitos que diferentes suplementações do mosto de mel possuem sobre o consumo do substrato, por parte das leveduras, para a produção de etanol.

A Tabela 5 apresenta os valores de TSS no início da fermentação dos mostos de mel em alguns trabalhos publicados na literatura.

**Tabela 5:** Valores iniciais dos TSS totais dos mostos de mel dos trabalhos de alguns autores.

<b>Autor(es)</b>	<b>TSS inicial (°Brix)</b>
<b>Amorim <i>et al.</i> (2018)</b>	28-32
<b>Brunelli (2015)</b>	30
<b>Czabaj <i>et al.</i> (2017)</b>	36
<b>Ferraz (2015)</b>	30
<b>Mendes-Ferreira <i>et al.</i> (2010)</b>	22,0-22,3
<b>Pereira <i>et al.</i> (2014)</b>	23
<b>Pereira <i>et al.</i> (2015)</b>	23,17
<b>Roldán <i>et al.</i> (2011)</b>	20-22

Fonte: O autor.

### 3.4.6.3. Perfil de compostos antioxidantes

A atividade antioxidante do hidromel está correlacionada aos compostos antioxidantes presentes no mel e nas demais matérias primas utilizadas para a elaboração desta bebida. A atividade antioxidante do mel se deve principalmente a compostos como polifenóis, ácidos orgânicos, peptídeos, enzimas, vitaminas e até produtos da reação de Maillard (GUPTA; SHARMA, 2009), que podem ser conservados após a fermentação do mosto de mel, conferindo propriedades antioxidantes ao mesmo.

O mel e o vinho possuem efeitos preventivos contra doenças ocasionadas pelo *stress* oxidativo ocasionado por radicais livres, há a hipótese de que o hidromel possua propriedades semelhantes (WINTERSTEEN; ANDRAE; ENGESETH, 2005).

Tratamentos térmicos aplicados no mosto de mel antes da fermentação, bem como a estocagem do mosto de mel, ou mesmo do próprio hidromel produzido, podem exercer

exercem influência na concentração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante do hidromel.

Czabaj *et al.* (2017) reportaram que, em mostos de mel monoflorais e de melato que sofreram diferentes tratamentos térmicos, os teores de compostos fenólicos totais e as atividades antioxidantes *in vitro* se apresentaram, quase sempre, superiores nos mostos que apresentaram tratamentos térmicos mais severos (fervura por 30 minutos) do que naqueles sem tratamento térmico ou com tratamento térmico brando (pasteurização a 65°C, por 10 minutos), indicando que o tratamento térmico gerou efeito benéfico sobre o perfil antioxidante do mosto de mel.

Conforme Kahoun, Řesková e Královský (2017), após o aquecimento de amostras de hidromel, a temperaturas de 40 a 100°C, por 60 minutos não ocorreram alterações significativas no conteúdo de compostos fenólicos e na atividade antioxidante do hidromel. Resultados semelhantes ocorreram quando os mesmos autores avaliaram os mesmos parâmetros e compostos em amostras de hidromel estocadas à temperatura ambiente, com incidência da luz, ou mantidas em refrigeração no escuro, após 1, 2, 4 e 12 semanas (KAHOUN; ŘESKOVÁ; KRÁLOVSKÝ, 2017).

Assim, subentende-se que os tratamentos térmicos exercem maior influência sob o perfil de compostos fenólicos e sob a atividade antioxidante quando aplicados no mosto de mel do que no hidromel.

#### 3.4.7. Clarificação do hidromel

A clarificação de bebidas alcoólicas objetiva a eliminação das partículas insolúveis responsáveis pela turvação da bebida e/ou pela formação de precipitado durante o armazenamento da mesma por refrigeração. Em vinhos e sidras, este procedimento pode ser realizado por filtração ou pela adição de produtos clarificantes, processo esse denominado colagem, podendo-se utilizar “colas” orgânicas tais como gelatina, albumina e caseína, ou minerais como a bentonite, que é uma argila com grande capacidade de expansão e poder de adsorção (AQUARONE *et al.*, 2001).

O processo de clarificação de hidromel por adição de bentonite foi realizado por Amorim (2017), que utilizou uma concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de uma suspensão de 10% desse agente clarificante hidratado em água destilada após a trasfega dos mostos de mel fermentados em escala laboratorial de bancada. Barrios *et al.* (2010) utilizaram uma concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> do mesmo composto, também após o término do processo fermentativo, para a clarificação de um hidromel obtido numa fermentação em escala

laboratorial de bancada ampliada (cerca de 20 L). Aquarone *et al.* (2001) recomendam a utilização de 0,04 a 0,08 g.L<sup>-1</sup> da bentonite para a clarificação de sidra e, para os vinhos, essa concentração pode variar de 0,04 a 0,10 g.L<sup>-1</sup>.

A utilização do carvão ativado pode constituir outra alternativa para o processo clarificação do hidromel, visto que o mesmo é bastante poroso e possui um elevado poder adsorvente em partículas das mais diversas como íons metálicos, corantes, fenóis e derivados fenólicos, dentre outros (NUNES, 2009), sendo utilizado para a purificação de água, ar soluções, dentre outras misturas.

Hidrocolóides como gelatina, ágar e polissacarídeos como a carboximetilcelulose (CMC) e gomas podem ser eficazes na estabilização e clarificação de bebidas devido às suas propriedades de suspensão e floculação (PENNA, 2004; PHILLIPS; WILLIAMS, 2000; ROHR, 2007). A gelatina, quando adicionada a sucos, especialmente os de maçã, captura moléculas em suspensão e as coagula, ajudando assim na clarificação dos mesmos (GUPTA; SHARMA, 2009).

A clarificação do hidromel, assim como no caso dos vinhos e de sucos de frutas, pode ser realizada pelo uso de pectinases comerciais (KOBLOITZ, 2008; UENOJO; PASTORE, 2007). A adição de pectinases em sucos reduz a viscosidade e provoca a precipitação das partículas de turvação, facilitando a sua remoção pelos processos de filtração e de centrifugação (KOBLOITZ, 2008).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. MATÉRIAS-PRIMAS**

#### **4.1.1. Obtenção**

O mel, marca é Flor e Ser, foi obtido (Figura 7) através da Cooperativa de Apicultores do município de Ribeira do Pombal (COOARP), Bahia. Já a graviola e o feijão-caupi (Figura 8) foram adquiridos no comércio local (feiras livres) do município de Feira de Santana, Bahia.

**Figura 7:** Embalagem (A) e rótulo com informação nutricional (B) do mel utilizado como suplementos no mosto de mel para a produção de hidromel.



Fonte: O autor.

**Figura 8:** Graviola (A) e feijão-caupi (B) utilizados como suplementos no mosto de mel para a produção de hidromel.



Fonte: O autor.

A estocagem do mel foi realizada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente enquanto que a graviola, previamente higienizada, após despulpamento e separação da sua polpa líquida e fibra foi estocada, sob estas duas formas, em garrafas plásticas estéreis, sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), forma essa também utilizada para estocar o feijão-caupi e o extrato elaborado a partir do mesmo.

#### 4.1.2. Caracterização físico-química

Os métodos para realizar as análises físico-químicas do mel, graviola e do extrato de feijão-caupi utilizados para a elaboração dos mostos de mel fermentados na produção do hidromel encontram-se nas Tabelas 6 a 8. Todas as análises físico-químicas foram realizadas

em triplicata e os resultados calculados por média dos resultados com seus respectivos desvios-padrão.

**Tabela 6:** Análises físico-químicas realizadas no mel utilizado para a elaboração dos mostos de mel.

Parâmetro físico-químico	Método de análise	Referência do método utilizado
Acidez total	Titulação simples	Instituto Adolfo Lutz (2008)
pH	Leitura em pHmetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Cor	Leitura de absorbância em espectrofotômetro (630 nm) e correlação com escala de Pfund	Bianchi (1981)
TSS totais	Leitura em refratômetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Umidade	Correlação com índice de refração lido em refratômetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Cinzas	Incineração em mufla (550°C)	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Proteínas	Kjeldahl modificado	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Lipídios	Bligh-Dyer	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Compostos fenólicos totais	Reação com Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio (2% m/v) e leitura em espectrofotômetro (760 nm)	Degasparj, Waszczynski e Santos (2004) Georgé <i>et al.</i> (2005)
Açúcares totais	Reação com antrona e ácido sulfúrico e leitura em espectrofotômetro (630 nm)	Trevelyan e Harrison (1952)
Açúcares redutores	Reação com DNS e leitura em espectrofotômetro (540 nm)	Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013)

Fonte: O autor.

**Tabela 7:** Análises físico-químicas realizadas na graviola utilizada para a elaboração dos mostos de mel.

Parâmetro físico-químico	Método de análise	Referência do método utilizado
Acidez total	Titulação simples	Instituto Adolfo Lutz (2008)
pH	Leitura em pHmetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
TSS totais	Leitura em refratômetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Umidade	Secagem em estufa a vácuo (70°C)	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Cinzas	Incineração em mufla (550°C)	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Proteínas	Kjeldahl modificado	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Lipídios	Bligh-Dyer	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Compostos fenólicos totais	Reação com Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio (2% m/v) e leitura em	Degasparj, Waszczynski e Santos (2004) Georgé <i>et al.</i> (2005)

	espectrofotômetro (760 nm)	
<b>Açúcares totais</b>	Reação com antrona e ácido sulfúrico e leitura em espectrofotômetro (630 nm)	Trevelyan e Harrison (1952)
<b>Açúcares redutores</b>	Reação com DNS e leitura em espectrofotômetro (540 nm)	Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013)

**Fonte:** O autor.

**Tabela 8:** Análises físico-químicas realizadas no extrato de feijão caupi, utilizado para a elaboração dos mostos de mel.

<b>Parâmetro físico-químico</b>	<b>Método de análise</b>	<b>Referência do método utilizado</b>
<b>TSS totais</b>	Refratômetro	Instituto Adolfo Lutz (2008)
<b>Proteínas</b>	Kjeldahl modificado	Instituto Adolfo Lutz (2008)
<b>Açúcares totais</b>	Reação com antrona e ácido sulfúrico e leitura em espectrofotômetro (630 nm)	Trevelyan e Harrison (1952)
<b>Açúcares redutores</b>	Reação com DNS e leitura em espectrofotômetro (540 nm)	Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013)

**Fonte:** O autor.

#### 4.2. SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

A seleção da levedura utilizada na fermentação dos mostos de mel para a produção do hidromel foi realizada através da avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em placas de Petri com meio sólido, autoclavadas a 121°C, por 15 minutos, com composição determinada pelo método proposto por Ono *et al.* (1991): peptona (0,3%); extrato de levedura (0,5%); glicose (4%); sulfato de amônio (0,02%); acetato de chumbo (0,1%); ágar (2%).

As leveduras comerciais que foram avaliadas quanto à produção de sulfeto de hidrogênio nas placas com o meio mencionado anteriormente, como observado na Figura 9, foram: Côte des Blancs, Red Star<sup>®</sup>, cepa de *S. bayanus* indicada para a elaboração de vinho e hidromel; Premier Cuveé, Red Star<sup>®</sup>, cepa de *S. bayanus* indicada para a produção de vinho; e Safbrew Abbaye, Fermentis<sup>®</sup>, cepa de *S. cerevisiae* indicada para a produção de cerveja.

**Figura 9:** Leveduras utilizadas no teste de produção de sulfeto de hidrogênio, Côte des Blancs (A), Premier Cuvée (B) e Safbrew Abbaye (C).



Fonte: O autor.

Inicialmente as leveduras comerciais foram pré-ativadas em 300 mL de meio YM, contendo peptona (1%), extrato de levedura (0,5%), extrato de malte (0,5%) e glicose (2%), conforme Guimarães (2005), incubadas em agitador rotatório (Tecnal TE-420), por 48 h, rotação de 150 rpm e temperatura igual a 30°C.

Após isso, as leveduras foram propagadas no meio YM semeadas, por estrias simples, e incubadas por 240 horas a 25°C em estufa do tipo incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), Quimis®, modelo Q315M25. Ao final do período de incubação, foi verificada as intensidades das cores das colônias de levedura presentes no meio sólido contido nas placas de Petri.

#### 4.3. FERMENTAÇÕES DE MOSTO DE MEL PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL

##### 4.3.1. Verificação do efeito da suplementação com extrato de feijão caupi

Inicialmente, para o preparo do extrato de feijão caupi, essa leguminosa foi triturada e misturada em água destilada. A mistura obtida (150 g.L<sup>-1</sup> de feijão caupi) foi aquecida em autoclave, a 121°C, por 30 minutos. O material autoclavado foi centrifugado (centrífuga Excelsa Baby I FANEM), a uma rotação de 3500 rpm, por 10 minutos e, após isso, o sobrenadante obtido foi armazenado em frascos plásticos estéreis e aquecido em banho-Maria (75°C, 15 min) com o intuito de eliminar células viáveis provenientes de uma eventual contaminação ambiental durante o processo de centrifugação. Após esse processo, os frascos



contendo o extrato de feijão caupi foram armazenados sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) para o seu uso posterior.

Para o preparo dos mostos de mel, a levedura comercial selecionada no teste de produção de sulfeto de hidrogênio em placas com o meio sólido YM, foi pesada de acordo com as instruções do fabricante (contidas no rótulo), propagada em frascos Erlenmeyer previamente esterilizados contendo mel diluído em água destilada estéril ( $30^{\circ}\text{Brix}$ ), e colocadas em agitador rotatório (Tecnal TE-420), a  $30^{\circ}\text{C}$ , agitação de 150 rpm, por aproximadamente 24 horas, a fim de se obter uma concentração celular igual ou próxima a  $10^7$  células/mL.

Os ensaios de fermentação foram realizados em frascos Erlenmeyer de capacidade nominal igual a 500 mL, com 50% do volume nominal preenchido (250 mL) com mosto de mel e água ( $30^{\circ}\text{Brix}$ ), sendo que 10% deste volume (25 mL) era correspondente ao inóculo das células da levedura comercial anteriormente propagada no mosto de mel. O mosto de mel e água foi suplementado com sulfato de amônio ( $1\text{ g.L}^{-1}$ ), cloreto de magnésio ( $0,1\text{ g.L}^{-1}$ ) e o extrato de feijão caupi nas concentrações de 0, 5 e  $30\text{ g.L}^{-1}$ , sendo realizadas triplicatas de ensaios referentes a essas concentrações deste extrato. O pH inicial do mosto foi ajustado para 5,0, utilizando carbonato de cálcio.

Os frascos Erlenmeyer foram acoplados com válvulas Airlock preenchidas com álcool etílico (70% v/v) e incubados em estufa do tipo incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante 240 h. A cada 24 h, para o acompanhamento dos parâmetros fermentativos, foram realizadas coletas de amostras para determinar a concentração celular e o TSS, sendo que parte das amostras coletadas foram armazenadas em frascos Eppendorf, e congeladas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) para posteriores análises de açúcares (glicose, frutose e sacarose), álcoois (etanol e glicerol), e determinação de peso seco de leveduras.

#### 4.3.2. Avaliação do efeito da concentração da graviola, da fibra deste fruto e do pH

Para avaliar o efeito da concentração da graviola, da fibra desta fruta, e do pH na fermentação dos mostos de mel, inicialmente foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$ , com triplicata do ponto central, conforme Rodrigues e Iemma (2009), variando a concentração de graviola (% m/v), percentual de fibra de graviola (% m/m), dentro da própria massa adicionada deste fruto, e o pH inicial do mosto, conforme Tabela 9.

**Tabela 9:** Matriz experimental dos ensaios do planejamento fatorial  $2^3$ , com triplicata do ponto central, para verificação do efeito da concentração da graviola, da fibra deste fruto, e do pH inicial, sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel.

Ensaio	Concentração de graviola		Percentual de fibra de graviola		pH inicial do mosto	
	Valor Codificado	Valor real (% m/v)	Valor Codificado	Valor real (% m/m)	Valor Codificado	Valor real
1	+1	30	+1	50	+1	6,5
2	+1	30	+1	50	-1	3,5
3	+1	30	-1	0	+1	6,5
4	+1	30	-1	0	-1	3,5
5	-1	10	+1	50	+1	6,5
6	-1	10	+1	50	-1	3,5
7	-1	10	-1	0	+1	6,5
8	-1	10	-1	0	-1	3,5
9	0	20	0	25	0	5,0
10	0	20	0	25	0	5,0
11	0	20	0	25	0	5,0

Fonte: O autor.

Além dos ensaios descritos anteriormente, foram realizados 3 ensaios controles, todos em triplicata, sem a adição de graviola, de acordo com a Tabela 10.

**Tabela 10:** Matriz experimental dos ensaios controle (sem adição de graviola) sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel.

Ensaio	Concentração de graviola		Percentual de fibra de graviola		pH inicial do mosto
	Valor Codificado	Valor real (% m/v)	Valor Codificado	Valor real (% m/m)	Valor Codificado
Controle 1	---	0	---	0	-1
Controle 2	---	0	---	0	0
Controle 3	---	0	---	0	+1

Fonte: O autor.

Além dos ensaios descritos nas Tabelas 9 e 10, foram realizados mais 4 ensaios com as condições intermediárias das duas variáveis experimentais de entrada (dentre as 3 apresentadas na Tabela 9) mais significativas em relação à produtividade volumétrica de etanol ( $Q_P$ ) e à eficiência fermentativa ( $\epsilon_f$ ), sendo ambas as variáveis de resposta, conforme

tratamento estatístico realizado com os 11 ensaios descritos na Tabela 9. Neste caso, a variável experimental de entrada menos significativa foi mantida fixa na sua condição central (valor codificado igual a 0), conforme pode ser observado na Tabela 11.

**Tabela 11:** Matriz experimental dos ensaios complementares, com os valores codificados das variáveis experimentais de entrada, para verificação do efeito da suplementação da graviola, e do pH inicial, sobre a fermentação de mostos de mel para a produção de hidromel.

Ensaio	Valores codificados das variáveis experimentais de entrada		
	Variável significativa 1	Variável significativa 2	Variável não significativa
12	0	+1	0
13	+1	0	0
14	0	-1	0
15	-1	0	0

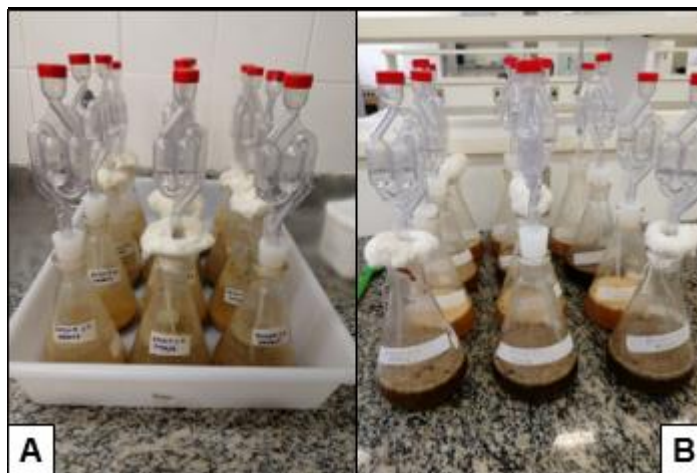
Fonte: O autor.

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata, sendo que, semelhantemente à etapa de verificação do efeito da suplementação com extrato de feijão-caupi sobre os mostos de mel durante a fermentação, os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de capacidade nominal igual a 500 mL, com 50% do volume nominal preenchido (250 mL) com mosto de mel (30° Brix), com 10% deste volume (25 mL) correspondendo ao inóculo das células da levedura comercial, propagadas mosto de mel diluído em água destilada esterilizada (30°Brix), a fim de obter uma concentração celular inicial de  $10^6$  cels.mL<sup>-1</sup> nos mostos que serão fermentados.

Os mostos de mel foram suplementados com sulfato de amônio (1 g.L<sup>-1</sup>), cloreto de magnésio (0,1 g.L<sup>-1</sup>), extrato de feijão caupi (30 g.L<sup>-1</sup>), e graviola sob a forma de polpa líquida pura ou misturada com a fibra da própria graviola, nas concentrações estabelecidas pelas matrizes experimentais apresentadas nas Tabelas 9 a 11. Os valores iniciais de pH dos mostos foram ajustados para os valores determinados nas Tabelas 9 a 11, sendo estes ajustados com ácido cítrico e/ou hidróxido de magnésio.

Os frascos Erlenmeyer (Figuras 10 e 11), contendo os mostos de mel correspondentes aos ensaios da matriz experimental de condições para a verificação da suplementação com graviola e do pH inicial sobre a fermentação, foram todos acoplados com válvulas Airlock preenchidas com álcool etílico (70% v/v), incubados em estufa do tipo incubadora BOD, por 288 h.

**Figura 10:** Mostos de mel, suplementados com graviola e extrato de feijão-caupi, recém preparados, referentes aos ensaios de 1 a 4 (A), e de 5 a 8 (B), todos em triplicata.



Fonte: O autor.

**Figura 11:** Mostos de mel, suplementados com graviola e extrato de feijão caupi, recém preparados, referentes aos ensaios de 9 a 11 e controles 1 a 3 (A), e de 12 a 15 (B), todos em triplicata.



Fonte: O autor.

A cada 24h foram realizadas coletas de amostras para determinar a concentração celular de leveduras e teor de sólidos solúveis totais. Parte das amostras coletadas foram armazenadas em frascos *Eppendorf* e congeladas (-18°C) para realização de análises de açúcares redutores e de etanol.

#### 4.3.3. Fermentação em escala laboratorial ampliada

O ensaio que proporcionou o melhor desempenho fermentativo, avaliado a partir das variáveis experimentais de resposta ( $\epsilon_f$  e  $Q_p$ ), nas fermentações do planejamento fatorial para a produção de hidromel, foi reproduzido numa escala laboratorial ampliada, num recipiente de material plástico atóxico (Figura 12), previamente higienizado, de capacidade nominal igual a 10 L, preenchido pela metade (5 L) com o mosto de mel suplementado com os

mesmos ingredientes, usando as concentrações correspondentes ao ponto ótimo experimental. À tampa do vaso de fermentação foi acoplada uma válvula Airlock, preenchida com álcool etílico a 70%, e uma mangueira de PVC atóxico para a coleta de amostras durante o período de fermentação, e o mesmo foi transferido para o interior de uma estufa do tipo incubadora BOD, Quimis®, modelo Q315M25, a 30°C, por 288 h.

**Figura 12:** Mosto de mel, suplementado com graviola e extrato de feijão caupi, para fermentação em escala laboratorial ampliada.



**Fonte:** O autor.

O acompanhamento da fermentação foi realizado da mesma forma que nas fermentações anteriores a esta: coletas, a cada 24 h, de amostras para determinação da concentração celular de leveduras, TSS totais, pH, além de coletas para leitura de absorvância (420, 520 e 620 nm) e transmitância a 660 nm (%Trans660) para determinar a intensidade da cor (I), tonalidade (T), percentual da cor amarela (% Amarelo) conforme as equações 10 a 12 (GLORIES, 1984), a seguir, sendo A420, A520 e A620 as absorvâncias a 420, 520 e 620 nm, respectivamente.

$$I = A420 + A520 + A620 \quad (\text{eq. 10})$$

$$T = A420 / A520 \quad (\text{eq. 11})$$

$$\% \text{ Amarelo} = (A_{420} / I) \times 100 \quad (\text{eq. 12})$$

Parte das amostras foram disponibilizadas em frascos Eppendorf e congeladas (-18°C) para posterior realização de análises de açúcares redutores e etanol.

#### 4.3.4. Clarificação do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada

O hidromel produzido em escala laboratorial ampliada foi trasfegado por filtração à vácuo e disponibilizado em garrafas de PET de 500 mL, sendo as mesmas preenchidas pela metade com o hidromel trasfegado, conforme pode ser observado na Figura 13, contendo cada uma, bentonite (previamente hidratada em água destilada estéril, numa concentração 10% m/v), carvão ativado ou carboximetilcelulose (CMC), nas concentrações de 0,5 a 2,5 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 12) e armazenadas sob refrigeração (4°C).

**Tabela 12:** Matriz experimental dos ensaios para verificação do efeito da adição de bentonite, carvão ativado e carboximetilcelulose sobre a clarificação do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada.

Ensaio de clarificação	Agente clarificante utilizado e concentração
Controle	Nenhum
BEN 0.5	Bentonite hidratada (0,5 g.L <sup>-1</sup> )
BEN 1.5	Bentonite hidratada (1,5 g.L <sup>-1</sup> )
BEN 2.5	Bentonite hidratada (2,5 g.L <sup>-1</sup> )
CAT 0.5	Carvão ativado (0,5 g.L <sup>-1</sup> )
CAT 1.5	Carvão ativado (1,5 g.L <sup>-1</sup> )
CAT 2.5	Carvão ativado (2,5 g.L <sup>-1</sup> )
CMC 0.5	Carboximetilcelulose (0,5 g.L <sup>-1</sup> )
CMC 1.5	Carboximetilcelulose (1,5 g.L <sup>-1</sup> )
CMC 2.5	Carboximetilcelulose (2,5 g.L <sup>-1</sup> )

Fonte: O autor.

A cada 72 h foram coletadas amostras para, a partir da leitura dos valores de absorvância (420, 520 e 620 nm) e transmitância (660 nm), determinar a intensidade da cor, tonalidade, percentual da cor amarela e turbidez conforme as equações 10 a 12. Todas as leituras de absorvância e transmitância foram realizadas em triplicata.

Após 360 h, os hidroméis clarificados foram novamente trasfegados, desta vez por centrifugação (3500 rpm, 10 min), armazenados em novas garrafas de PET previamente higienizadas (Figura 14), e estocadas sob refrigeração. Amostras dos produtos finais foram

coletadas a fim de realizar a caracterização físico-química, atestando assim a sua qualidade de acordo com o regulamento técnico estabelecido pelo anexo III, da Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008 (BRASIL, 2008b).

**Figura 13:** Garrafas contendo hidromel em processo de clarificação.



**Fonte:** O autor.

**Figura 14:** Garrafas contendo hidroméis centrifugados após término do processo de clarificação.



**Fonte:** O autor.

#### 4.3.5. Determinação das concentrações celulares e dos teores de glicose, frutose, sacarose, etanol, glicerol e ácido acético presentes no mosto de mel durante a fermentação

Os valores de concentração celular ( $\text{cels.mL}^{-1}$ ) foram determinados a partir de contagem em câmara de Neubauer ( $1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$ ), sendo que para determinar o número de células viáveis e não viáveis, utilizou-se o Método Internacional de Coloração, conforme Asbc (1996), utilizando o corante azul de metileno. O teor de sólidos solúveis

(°Brix) de cada amostra foi determinado a partir de um refratômetro digital portátil (Reichert Tecnal AR-200, Piracicaba, SP, Brasil).

Os teores de açúcares redutores foram realizados conforme Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), através da reação da amostra de hidromel com DNS, a 100°C, e posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (Femto 600 plus) a 540 nm, enquanto que os teores volumétricos de etanol foram determinados por leitura em densímetro de bancada (Rudolph Research Analytical, modelo DDM 2911).

As concentrações de glicose, frutose, sacarose, etanol, glicerol e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (Waters 2414, USA), utilizando uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H (300 × 7.8), detector de índice de refração RID 6A, tendo como eluente ácido sulfúrico (0.005 M) num fluxo médio de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, a 45°C.

#### 4.3.6. Caracterização físico-química do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada

No que se refere às análises físico-químicas realizadas com o hidromel produzido em escala ampliada, o teor volumétrico de etanol foi determinado por leitura em densímetro de bancada (Rudolph Research Analytical, modelo DDM 2911), os teores de acidez total, fixa e volátil foram determinados pelos métodos descritos por Instituto Adolfo Lutz (2008) para determinar esses parâmetros em vinhos de uva: titulação simples da amostra de hidromel com solução de NaOH 0,1 N, para a determinação da acidez total; titulação de uma amostra oriunda da destilação por arraste de vapor, para determinar a acidez volátil; e a acidez fixa consistiu na diferença dos valores encontrados de acidez total e volátil.

O pH do hidromel foi determinado por leitura em pHmetro portátil (AKSO AK90), enquanto o extrato seco reduzido desta bebida foi determinado pela diferença da concentração de açúcares totais com a concentração de extrato seco, que foi determinada por evaporação e secagem em estufa, método esse aplicável para a determinação deste parâmetro em vinhos secos e outras bebidas fermentadas com extrato seco menor que 30 g.L<sup>-1</sup> (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os teores de açúcares redutores foram realizados conforme Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), através da reação da amostra de hidromel com DNS, a 100°C, e posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (Femto 600 plus) a 540 nm, enquanto que as concentrações de açúcares totais foram determinadas conforme Trevelyan e Harrison (1952),



por reação da amostra (a 100 °C) com solução de antrona (2 g.L<sup>-1</sup> em ácido sulfúrico concentrado) e posterior leitura em espectrofotômetro (Femto 600 plus), a 630 nm.

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados conforme Degasparj, Waszczyński e Santos (2004) e Georgé *et al.* (2005), através da reação da amostra de hidromel com Reação com Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio (2% m/v), a 50°C, e posterior leitura em espectrofotômetro (Femto 600 plus) a 760 nm. Os resultados foram expressos em mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

#### 4.3.7. Cinética dos processos fermentativos

Para a realização da cinética dos processos fermentativos, foram determinados os pesos secos das massas de leveduras contidas nas amostras de mosto de mel, coletados durante os períodos de fermentação, que foram armazenadas em frascos Eppendorf. As amostras foram previamente tratadas com celulase comercial Viscozyme L, da Novozymes®, numa concentração de 0,5%, para a hidrólise das fibras insolúveis oriundas dos ingredientes componentes dos mostos de mel.

O procedimento foi realizado conforme Hamelink (2005), a 50° por 36 h e, após isso, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, numa centrífuga refrigerada (Eppendorf® 5810 R). Após o processo de centrifugação, os sobrenadantes dos tubos foram separados das massas celulares sólidas, sendo determinado o peso seco das leveduras oriundas das amostras de mosto de mel em fermentação, por secagem em estufa a vácuo (Quimis®, DZF-6030), a 70°C.

As concentrações mássicas celulares encontradas (em g.L<sup>-1</sup>), obtidas pela divisão de cada massa encontrada de leveduras (g) pelo volume de mosto contido no Eppendorf (L), juntamente com as velocidades instantâneas de crescimento celular (dX/dt), consumo de substrato (dS/dt) e produção de etanol (dP/dt), calculadas de acordo com o método proposto por Le Duy e Zajic (1973), foram utilizadas para a determinação das velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_x$ ), consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produção de etanol ( $\mu_p$ ).

#### 4.3.8. Tratamento estatístico das variáveis de resposta dos ensaios para verificação do efeito da graviola sobre os mostos de mel em fermentação

Os resultados das variáveis experimentais de resposta ( $E_f$  e  $Q_p$ ) dos ensaios fermentativos 1 a 11 foram tratados estatisticamente utilizando-se o software Statistica 7.0, onde foram gerados gráficos de superfície de destas mesmas variáveis em relação às variáveis

de entrada experimentais utilizadas no planejamento fatorial  $2^3$  (ver Tabela 11), nos tempos em que os teores de sólidos solúveis, de açúcares redutores totais e de etanol nos mostos de mel em fermentação começaram a se estabilizar.

Utilizando-se o mesmo software, foi realizada a ANOVA de duas vias, por erro puro, com 95% de intervalo de confiança, a fim de verificar, dentre outros aspectos, se os efeitos das variáveis e das interações entre as variáveis experimentais de entrada foram significativos sobre cada resposta experimental avaliada num tempo de fermentação.

Após este primeiro tratamento estatístico, foram avaliados os valores de  $R^2$  das ANOVA e as variáveis experimentais de entrada (e interações entre as mesmas) que apresentaram efeito significativo sobre cada variável experimental de resposta ( $Q_P$  ou  $E_f$ ) individualmente e, a partir disto, os resultados da ANOVA que apresentaram maior valor de  $R^2$  foram utilizados para escolher as duas variáveis experimentais de entrada que seriam utilizadas em condições intermediárias das duas variáveis experimentais de entrada, para a realização dos ensaios 12 a 15 conforme descrito na Tabela 11.

Após a realização dos ensaios 12 a 15, as duas variáveis experimentais de entrada mencionadas anteriormente, desta vez compreendendo os ensaios 1 a 15, foram tratadas estatisticamente no mesmo software, realizando-se as mesmas análises, porém em caráter de delineamento composto central  $2^2$ . Novamente foram avaliados os efeitos sobre as variáveis experimentais de entrada (e interações entre as mesmas) que apresentaram efeito significativo sobre cada resposta ( $Q_P$  ou  $E_f$ ) individualmente e, a partir dos dados da ANOVA com maior valor de  $R^2$ , foram gerados gráficos de superfície de em função das variáveis experimentais de entrada, a sua equação correspondente e os valores críticos das variáveis experimentais de entrada que, a partir dos mesmos, foram definidas as condições para a realização da fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS**

As propriedades físico-químicas do mel, bem como os valores de referência estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA, se encontram na Tabela 13, a seguir.

**Tabela 13:** Propriedades físico-químicas do mel e os valores de referência estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA.

Parâmetro físico-químico	Unidade de medida do	Média ± D. P. <sup>a</sup>	Valor de referência
	resultado		
Acidez total	mEq.kg <sup>-1</sup>	30,3 ± 0,4	Máx. 50
pH	---	3,34 ± 0,05	---
Cor	mm	14,7 ± 0,2	---
TSS totais	°Brix	80,0 ± 0,1	---
Umidade	% m/m	18,3 ± 0,1	Máx. 20
Cinzas	% m/m	0,264 ± 0,026	Máx. 0,6
Proteínas	% m/m	0,7 ± 0,1	---
Lipídios	% m/m	0,0 ± 0,0	---
Compostos fenólicos totais	mg.kg <sup>-1</sup> (ácido gálico)	276,4 ± 10,0	---
Açúcares totais	% m/m	80,3 ± 1,8	---
Açúcares redutores	% m/m	71,7 ± 1,4	Mín. 65

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão

Fonte: O autor.

De acordo com a Tabela 13, o mel está em conformidade com os padrões físico-químicos de qualidade desta matéria-prima, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA. A Tabela 14, a seguir, estão expressos os parâmetros físico químicos anteriormente apresentados (para o mel do presente trabalho, marca Flor e Ser) na Tabela 13 e os reportados, por outros autores, em méis caracterizados em seus respectivos trabalhos.

**Tabela 14:** Comparação dos parâmetros físico-químicos do mel caracterizado no presente trabalho (marca Flor e Ser) com os reportados nos méis referentes aos trabalhos de outros autores.

Parâmetro físico-químico	Valores experimentais					
	Mel Flor e Ser <sup>a</sup>	Amorim (2017) <sup>b</sup>	Brunelli (2015) <sup>b</sup>	Džugan <i>et al.</i> (2018)	Moraes <i>et al.</i> (2014)	Richter <i>et al.</i> (2011)
Acidez total (mEq.kg <sup>-1</sup> )	30,3 ± 0,4	24,4	16,21	---	24,53 – 33,45	13,45 – 40,30
pH	3,34 ± 0,05	3,42	4,49	---	3,94 – 3,98	---
Cor	14,7 ± 0,2	---	96,3	---	---	---
TSS totais (°Brix)	80,0 ± 0,1	---	80,10	---	---	---
Umidade (% m/m)	18,3 ± 0,1	18,73	---	---	19,22 – 19,53	15,4 – 20,9

<b>Cinzas (% m/m)</b>	0,264 ± 0,026	0,28	---	---	0,19	0,17 - 0,99
<b>Proteínas (% m/m)</b>	0,7 ± 0,1	0,71	---	---	---	---
<b>Lipídios (% m/m)</b>	0,0 ± 0,0	---	---	---	---	---
<b>Compostos fenólicos totais (mg.kg<sup>-1</sup> de ácido gálico)</b>	276,4 ± 10,0	---	---	254,52 – 630,29	---	---
<b>Açúcares totais (% m/m)</b>	80,3 ± 1,8	100,0	---	---	---	---
<b>Açúcares redutores (%m/m)</b>	71,7 ± 1,4	22,7	---	---	---	55,83 – 70,21

<sup>a</sup> Dados expressos em valores médios ± desvio-padrão.

<sup>b</sup> Em todos, ou em parte dos dados, foram realizadas conversões das unidades de medida originais para as mesmas dos valores experimentais do presente trabalho.

**Fonte:** O autor.

Os méis apresentaram valores de acidez total, pH e TSS totais, umidade e proteínas relativamente próximos. O mel Flor e Ser não apresentou lipídeos na sua composição. Segundo Lima *et al.* (2011) o mel normalmente não contém lipídeos na sua composição.

Os teores de cinzas encontrados no Mel Flor e Ser foram semelhantes aos encontrados por Amorim (2017) e bem menores do que os maiores teores de cinzas encontrados nos méis referentes ao trabalho de Richter *et al.* (2011). Fatores como o solo, vegetação, e espécies vegetais nas quais as abelhas utilizaram para coletar o néctar podem ter sido fundamentais para ocasionar esta grande diferença nos teores de cinzas reportados pelos referidos autores.

No que se refere aos percentuais de açúcares, o mel Flor e Ser apresentou um teor de açúcares totais (80,3 ± 1,8% m/m) inferior ao encontrado no mel referente ao trabalho de Amorim (2017) apresentou um teor de açúcares totais (100,0 % m/m) maior, enquanto que, no que se refere ao teor de açúcares redutores o reportado no presente trabalho (71,7 ± 1,4 % m/m) foi muito maior do o reportado por Amorim (2017), mais especificamente 22,7% m/m.

A causa da diferença dos teores de açúcares nos méis dos referidos trabalhos, como exposto acima, pode ter ocorrido devido ao fato de que o mel Flor e Ser provavelmente possui teores muito maiores de glicose e frutose (açúcares redutores) do que os prováveis teores de sacarose no referido mel, enquanto que no mel referente ao trabalho de Amorim

(2017), o teor de sacarose provavelmente deveria ser muito superior aos de glicose e frutose. O mel Flor e Ser apresentou uma grande facilidade em sofrer cristalização durante o processo de estocagem e isso confirma que o mesmo provavelmente seria rico em glicose, visto que, segundo Peralta e Koblitz (2008), méis com maiores teores de glicose tendem a cristalizar mais facilmente.

No tocante aos teores de compostos fenólicos, ( $276,4 \pm 10,0$ )  $\text{mg.kg}^{-1}$ , de ácido gálico, encontrados no mel Flor e Ser, os mesmos se mostraram próximos aos menores valores ( $254,52 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e nos méis referentes ao trabalho de Džugan *et al.* (2018), porém muito menores do que os maiores teores destes compostos ( $630,29 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) reportados nos méis dos referidos autores. Assim como no caso referente aos teores de cinzas nos méis, fatores como o solo, vegetação, e espécies vegetais nas quais as abelhas utilizaram para coletar o néctar podem ter sido fundamentais para ocasionar esta grande diferença nos teores de compostos fenólicos reportados.

Um indicativo de que o mel possui um alto teor de compostos fenólicos é a cor do mesmo. Visto que, conforme Peralta e Koblitz (2008), altos teores de compostos fenólicos são normalmente mais escuros. O mel Flor e Ser, utilizado no presente trabalho, apresenta uma intensidade de cor igual a ( $14,7 \pm 0,2$ ), compatível com a coloração extrabrancos, a segunda coloração menos intensa conforme a Escala de Pfund (BIANCHI, 1981) e normalmente o mesmo apresentaria teores de compostos fenólicos inferiores à maioria dos méis utilizados para o preparo de hidroméis que, conforme Gupta e Sharma (2009), geralmente apresentam a coloração âmbar-claro.

As propriedades físico-químicas da graviola, bem como os valores de referência estabelecidos pela Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016, do MAPA, estão evidenciados na Tabela 15, enquanto que, a Tabela 16 apresenta uma comparação dos parâmetros físico-químicos do mel Flor e Ser com os reportados, por outros autores, em méis caracterizados em seus respectivos trabalhos.

**Tabela 15:** Propriedades físico-químicas da graviola e os valores de referência estabelecidos pela Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016, do MAPA.

Parâmetro físico-químico	Unidade de medida do resultado	Média $\pm$ D. P. <sup>a</sup>	Valor de referência
Acidez total	% m/m (ácido cítrico)	$1,11 \pm 0,05$	Mín. 0,60
pH	---	$4,25 \pm 0,05$	Mín. 3,50
TSS totais	°Brix	$17,3 \pm 0,2$	Mín. 9,00
Umidade	% m/m	$88,1 \pm 0,2$	---

<b>Cinzas</b>	% m/m	0,346 ± 0,035	---
<b>Proteínas</b>	% m/m	0,90 ± 0,09	---
<b>Lipídios</b>	% m/m	0,02 ± 0,00	---
<b>Compostos fenólicos totais</b>	mg.kg <sup>-1</sup> (ácido gálico)	1345,0 ± 65,0	---
<b>Açúcares redutores</b>	% m/m	4,25 ± 0,05	---
<b>Açúcares totais</b>	% m/m	12,4 ± 0,8	Mín. 3,50

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão

Fonte: O autor.

**Tabela 16:** Comparação dos parâmetros físico-químicos da graviola, caracterizada no presente trabalho, com os reportados por outros autores.

Parâmetro físico-químico	Valores experimentais				
	Presente trabalho <sup>a</sup>	Matos (2009) <sup>b</sup>	Sacramento <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>	Siqueira <i>et al.</i> (2015) <sup>b</sup>	Vit, Santiago e Pérez-Pérez (2014) <sup>b</sup>
<b>Acidez total (%m/m de ácido cítrico)</b>	1,11 ± 0,05	1,86	0,92 – 1,00	---	---
<b>pH</b>	4,25 ± 0,05	3,6	3,44 – 3,47	---	---
<b>TSS totais (°Brix)</b>	17,3 ± 0,2	14,0	12,18 – 13,85	---	---
<b>Umidade (% m/m)</b>	88,1 ± 0,2	---	---	79,34 – 81,14	86,32
<b>Cinzas (% m/m)</b>	0,346 ± 0,035	---	---	---	0,29
<b>Proteínas (% m/m)</b>	0,90 ± 0,09	---	---	1,02 – 1,10	0,32
<b>Lipídios (% m/m)</b>	0,02 ± 0,00	---	---	0,00 – 0,01	---
<b>Compostos fenólicos totais (mg.kg<sup>-1</sup> de ácido gálico)</b>	1345,0 ± 65,0	---	---	1544,0 – 3589,2	1934 – 3060
<b>Açúcares redutores (% m/m)</b>	4,25 ± 0,05	---	---	---	---
<b>Açúcares totais (% m/m)</b>	12,4 ± 0,8	---	---	11,91 – 14,70	---

<sup>a</sup> Dados expressos em valores médios ± desvio-padrão.

<sup>b</sup> Foram realizadas conversões das unidades de medida originais para as mesmas dos valores experimentais do presente trabalho.

Fonte: O autor.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 15, a graviola apresenta características que estão em conformidade com os padrões físico-químicos de qualidade desta matéria-prima, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA.

Os parâmetros físico-químicos da graviola utilizada no presente trabalho, conforme exposto na Tabela 16, apresentaram, em sua maioria, valores semelhantes aos frutos caracterizados pelos autores mencionados. Porém, o teor de umidade, além do pH e dos TSS totais reportados no presente trabalho foram maiores (e o teor de compostos fenólicos totais se apresentou menor) que os reportados pelos demais autores.

Isso poderia ser devido ao fato de que a variedade de graviola caracterizada no presente trabalho provavelmente foi diferente das utilizadas nos trabalhos dos referidos autores, visto que Sacramento *et al.* (2003) e Siqueira *et al.* (2015) ressaltam que diferentes variedades de graviola normalmente apresentam diferenças em suas composições, que também poderia estar influenciado pelo solo e por fatores climáticos.

A comparação entre os valores de proteínas, lipídios, açúcares totais e redutores do extrato de feijão-caupi (150 g.L<sup>-1</sup>, autoclavado a 121°C, por 15 minutos) utilizado no presente trabalho com os dos grãos dessa leguminosa avaliados por outros autores é apresentada na Tabela 17.

**Tabela 17:** Comparação dos parâmetros físico-químicos do extrato de feijão-caupi (150 g.L<sup>-1</sup>, autoclavado a 121°C, por 15 min), produzido e caracterizado no presente trabalho, com os reportados nos grãos de feijão-caupi.

<b>Parâmetro físico-químico</b>	Extrato de feijão-caupi <sup>a</sup>	Castellón <i>et al.</i> (2003)	Frota, Soares e Arêas (2008)	Souza-Silva <i>et al.</i> (2002)
<b>Proteínas (% m/m)</b>	0,53 ± 0,02	21,6 – 24,7	24,5	20,29 – 27,39
<b>Lipídios (% m/m)</b>	0,28 ± 0,03	1,2 – 1,7	2,2	0,53 – 3,08
<b>Açúcares totais (% m/m)</b>	5,33 ± 0,15	71,4 – 74,5	51,4	26,10 – 74,54
<b>Açúcares redutores (% m/m)</b>	0,88 ± 0,12	---	---	---

<sup>a</sup> Dados expressos em valores médios ± desvio-padrão.

**Fonte:** O autor.

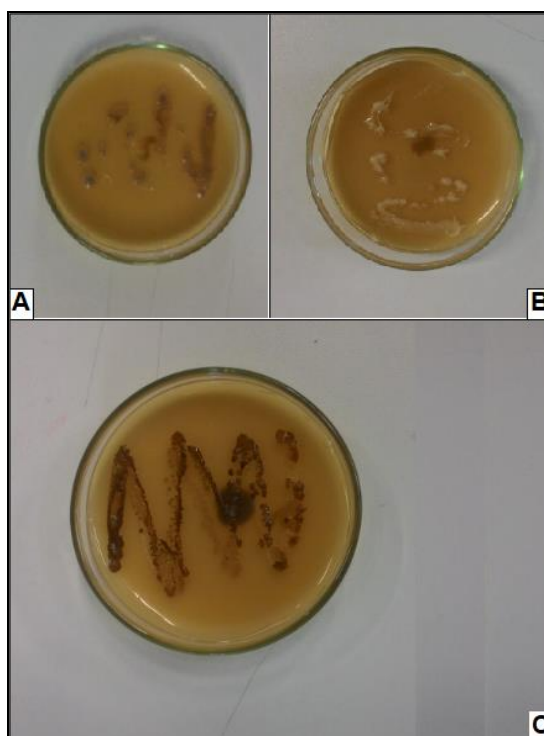
Os valores dos parâmetros físico-químicos do extrato de feijão-caupi indicam que o mesmo é uma boa fonte de açúcares, proteínas e lipídios para ser utilizado na suplementação do mosto de mel, porém os teores de açúcares e proteínas apresentaram-se inferiores aos reportados no mel e na graviola (Tabelas 13 a 16).

O conteúdo proteico do referido extrato foi equivalente a 1,9 - 2,6% dos valores reportados para os grãos desta leguminosa nos trabalhos dos autores mencionados na Tabela 17, porém, para o preparo do extrato, como mencionado anteriormente, foi utilizada uma concentração de  $150 \text{ g.L}^{-1}$  (ou seja, 15% m/v) desta leguminosa. Diante disto, pode-se constatar que grande parte do conteúdo proteico se perde durante o preparo do extrato desta leguminosa, provavelmente ficando retido na porção sólida correspondente ao conteúdo precipitado durante o processo de centrifugação.

## 5.2. AVALIAÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO PELAS LEVEDURAS

Os resultados da avaliação de sulfeto de hidrogênio pelas colônias das leveduras comerciais testadas podem ser visualizados na Figura 15.

**Figura 15:** Colônias de leveduras comerciais Cotê des Blancs (A), Premier Cuvée (B) e Safbrew Abbaye (C) em placas com o meio sólido para avaliação da produção de sulfeto de hidrogênio.



**Fonte:** O autor.

Observando a coloração das colônias das leveduras comerciais sobre as placas com meio sólido, percebe-se que as colônias da levedura comercial Premier Cuvée apresentaram coloração menos intensa do que as colônias das leveduras comerciais Cotê des Blancs e Safbrew Abbaye. Sendo assim, a levedura comercial Premier Cuvée foi a que produziu menos



sulfeto de hidrogênio no meio sólido e, por este motivo, foi selecionada para ser utilizada nos ensaios fermentativos.

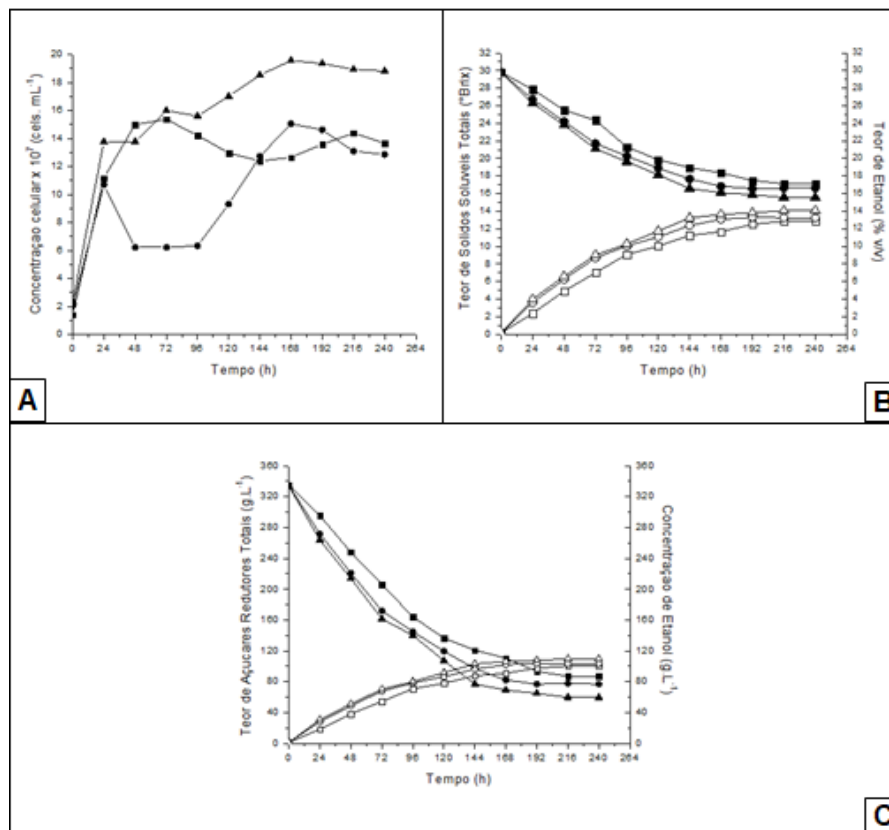
### 5.3. FERMENTAÇÕES DO MOSTO DE MEL PARA A PRODUÇÃO DE HIDROMEL

#### 5.3.1. Verificação do efeito da suplementação com extrato de feijão-caupi

##### 5.3.1.1. Perfis das concentrações celulares, de açúcares e dos produtos primários e secundários da fermentação

A seguir, estão expostas as concentrações celulares durante as fermentações dos mostos de mel (30° Brix) suplementados com extrato de feijão caupi nas concentrações de 0 a 30 g.L<sup>-1</sup> (Figura 16-A), bem como os perfis do teor de sólidos solúveis totais (g.L<sup>-1</sup>) e de etanol, em % v/v (Figura 16-B), além dos perfis das concentrações de açúcares redutores totais e de etanol (Figura 16-C).

**Figura 16:** Perfis de concentração celular (A) e dos teores de sólidos solúveis totais (B) e de açúcares totais (C), durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi, e os perfis do teor de etanol, em % v/v (B) e g.L<sup>-1</sup> (C), para os mostos com 0 (□), 5 (○) e 30 (Δ) g.L<sup>-1</sup> do mesmo extrato.



Fonte: O autor.

Durante quase todo o período fermentativo (com exceção do tempo de 48 h após o início das fermentações, as concentrações celulares (Figura 16-A) mais altas foram verificadas nos mostos de mel suplementados com a maior concentração do extrato de feijão-caupi ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), alcançando seu valor máximo após 168 h de fermentação ( $19,7 \times 10^7 \text{ cels.mL}^{-1}$ ).

Já nos mostos sem extrato de feijão-caupi e com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  do mesmo extrato, as concentrações celulares das leveduras se apresentaram nitidamente maiores nos mostos sem o extrato, com exceção do período de 144 a 192 h após o início das fermentações, onde foram registrados valores de concentração celular maiores do que os reportados para os mostos sem adição do extrato de feijão-caupi.

As maiores concentrações celulares registradas durante a fermentação dos mostos sem e com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato foram respectivamente iguais a  $15,4$  e  $15,0 \times 10^7 \text{ cels.mL}^{-1}$ , após 72 e 168 h de fermentação. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Balogu e Towobola (2017), que obtiveram, para uma cepa de *S. cerevisiae*, crescimento celular similar ( $16 \times 10^7 \text{ cels.mL}^{-1}$ , após 60h) em fermentação de mosto composto por uma mistura de mel e água de coco a  $25^\circ\text{C}$ , com pH inicial igual a 3,5, e concentração celular de inóculo igual a  $1,0 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ .

Mendes-Ferreira *et al.* (2010), utilizaram suplementação com fontes de nitrogênio de origem comercial (fosfato de amônio bibásico), e nos mostos com maior concentração destes suplementos ( $1,015 \text{ g.L}^{-1}$  de fosfato diamônico) o crescimento celular de uma cepa de *S. cerevisiae* foi favorecido em mostos de mel, visto que o tempo de tempo de cultivo necessário para encerrar a fermentação foi reduzido de 25 dias (nos mostos sem a suplementação) para 11 dias.

No presente trabalho, ficou nítido que a suplementação com extrato de feijão-caupi na concentração de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  estimulou o crescimento da população de leveduras (Figura 16-A). A adição de extrato ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) aparentemente exerceu um certo efeito inibitório sobre o crescimento celular.

No tocante ao consumo de substrato, observado através da redução dos teores de sólidos solúveis (TSS) e de açúcares redutores totais nos mostos de mel em fermentação, conforme as Figuras 17-A e 17-B, durante todo o período fermentativo quanto maior a concentração de extrato de feijão-caupi nos mostos, menores foram os valores dos TSS e das concentrações de açúcares totais, sendo que, após 240 h de fermentação, as reduções dos TSS, em relação ao início da fermentação, foram iguais a 42,6%, 44,3% e 47,8%, para os

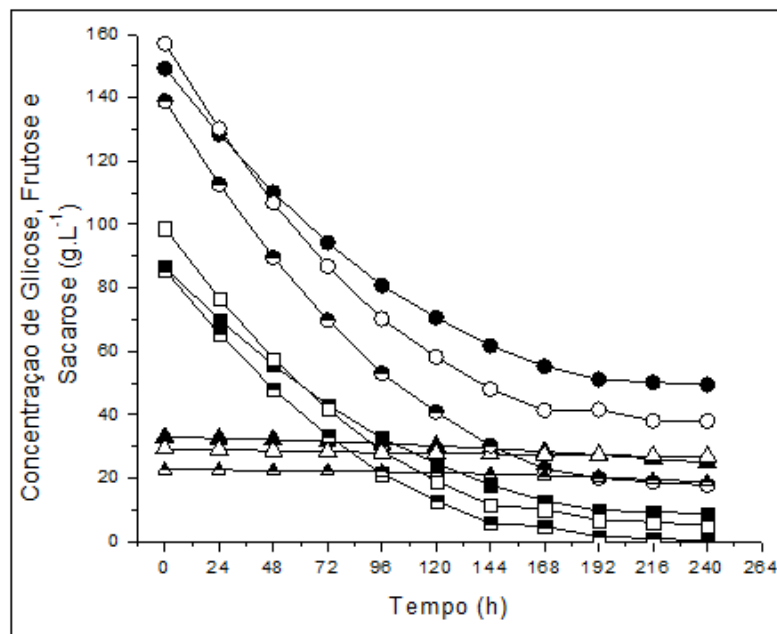
mostos com 0, 5 e 30 g.L<sup>-1</sup> de extrato, respectivamente, enquanto que as concentrações de açúcares redutores totais reduziram em 74,0%, 77,0% e 82,1%, respectivamente.

Em consequência do aumento do consumo do substrato em devido ao aumento da concentração de extrato de feijão-caupi na suplementação dos mostos de mel, para a produção de hidromel, qforam verificados maiores teores de etanol em todo o período fermentativo (Figuras 16-B e 16-C).

Após 240 h de fermentação, foram obtidos hidroméis com 12,9% v/v (100,2 g.L<sup>-1</sup>), 13,2% v/v (103,3 g.L<sup>-1</sup>) e 14,0 % v/v (109,7 g.L<sup>-1</sup>) de etanol, nos mostos com 0, 5 e 30 g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão-caupi, respectivamente. Esses resultados indicam que a suplementação com extrato de feijão-caupi teve efeito benéfico sobre o consumo dos açúcares do mosto de mel pela levedura na produção de etanol.

Os teores individuais dos açúcares glicose, frutose e sacarose, durante as fermentações dos mostos de mel suplementados com o extrato de feijão caupi podem ser observados na Figura 17. A Tabela 18 detalha as concentrações iniciais e finais destes açúcares, além dos percentuais de redução durante o período fermentativo.

**Figura 17:** Perfis das concentrações de glicose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (□), 5 (■) e 30 (▣) g.L<sup>-1</sup>; perfis das concentrações de frutose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (○), 5 (●) e 30 (●) g.L<sup>-1</sup> do mesmo extrato; e os perfis das concentrações de sacarose durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (Δ), 5 (▲) e 30 (▲) g.L<sup>-1</sup> do referido extrato.



Fonte: O autor.

**Tabela 18:** Concentrações de glicose, frutose, sacarose e açúcares totais, em g.L<sup>-1</sup>, nos tempos inicial (0 h) e final (240 h) de fermentação, e os respectivos percentuais de redução dessas concentrações, nos mostos de mel fermentados suplementados com extrato de feijão caupi.

Açúcar	Tempo de fermentação	Concentração de açúcares (g.L <sup>-1</sup> ) ± D. P. <sup>a</sup>		
		0 g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi	5 g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi	30 g.L <sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi
Glicose	Inicial (0 h)	86,5 ± 0,7	98,7 ± 0,8	85,6 ± 0,6
	Final (240 h)	8,6 ± 0,0	5,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	<b>Redução (%)</b>	<b>90,1 ± 0,1</b>	<b>94,9 ± 0,1</b>	<b>99,9 ± 0,0</b>
Frutose	Inicial (0 h)	149,2 ± 1,2	157,1 ± 1,3	138,9 ± 1,1
	Final (240 h)	49,5 ± 0,2	38,0 ± 0,2	17,8 ± 0,1
	<b>Redução (%)</b>	<b>66,8 ± 0,4</b>	<b>75,8 ± 0,3</b>	<b>87,2 ± 0,2</b>
Sacarose	Inicial (0 h)	32,9 ± 0,3	29,6 ± 0,2	22,5 ± 0,2
	Final (240 h)	24,8 ± 0,1	26,8 ± 0,1	18,7 ± 0,1
	<b>Redução (%)</b>	<b>24,6 ± 0,9</b>	<b>9,5 ± 1,1</b>	<b>16,8 ± 1,0</b>
Totais	Inicial (0 h)	268,6 ± 2,2	285,4 ± 2,3	247,0 ± 2,0
	Final (240 h)	82,9 ± 0,3	69,8 ± 0,3	36,6 ± 0,1
	<b>Redução (%)</b>	<b>69,1 ± 0,4</b>	<b>75,5 ± 0,3</b>	<b>85,2 ± 0,2</b>

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão

Fonte: O autor.

Como observado na Figura 17 e na Tabela 18, no início da fermentação (0 h) o açúcar predominante nos mostos, independente da concentração de extrato de feijão-caupi, foi a frutose, com concentrações entre (138,9 ± 1,1) g.L<sup>-1</sup> e (157,1 ± 1,3) g.L<sup>-1</sup>, enquanto que as concentrações iniciais de glicose e sacarose variaram de (85,6 ± 0,6) g.L<sup>-1</sup> a (98,7 ± 0,8) g.L<sup>-1</sup>, e de (22,5 ± 0,2) g.L<sup>-1</sup> a (32,9 ± 0,3) g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Quanto maior a concentração de extrato utilizado nos mostos, maiores foram os percentuais de redução, após 240 h de fermentação, das concentrações de glicose, de (90,1 ± 0,1)% a (99,9 ± 0,0)%, e de frutose, de (66,8 ± 0,4)% a (87,2 ± 0,2)% e, conseqüentemente, esse resultado se reproduziu na redução dos teores totais dos açúcares quantificados, de (69,1 ± 0,4)% a (85,2 ± 0,2)%. Porém, isso não ocorreu com os teores de sacarose cuja redução, após 240 h de fermentação, foi maior nos mostos sem adição extrato de feijão-caupi (24,6 ± 0,9)%, seguido dos mostos com 30 e 5 g.L<sup>-1</sup> do mesmo extrato, respectivamente iguais a (16,8 ± 1,1)% e (9,5 ± 1,0)%.

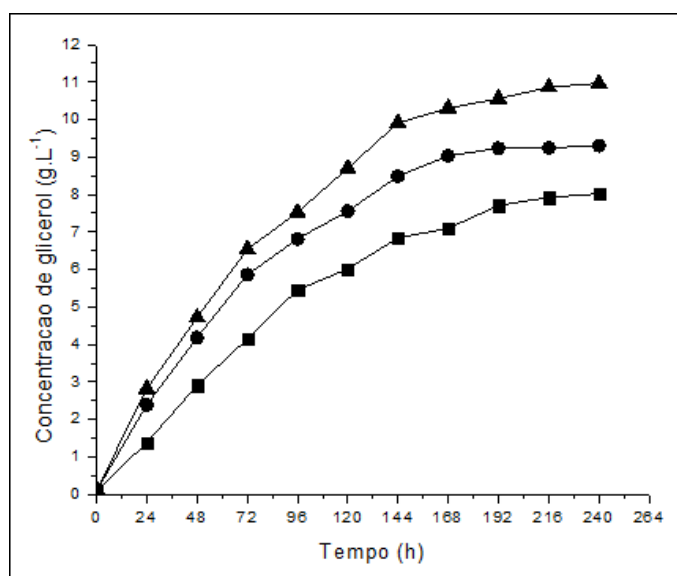
A glicose e a frutose foram os açúcares mais consumidos durante o processo fermentativo, e isso se deve ao fato dos mesmos serem açúcares redutores, sendo assim, sendo mais facilmente metabolizados pelas leveduras do gênero *Saccaromyces*, especialmente

a glicose, que é prontamente fermentescível por essas leveduras (LIMA *et al.*, 2001), enquanto que a sacarose é um dissacarídeo não redutor e precisa ser hidrolisada para gerar glicose e frutose que podem ser utilizadas na fermentação alcoólica conduzida por leveduras.

Ilha *et al.* (2008) relataram valores similares para o consumo de substrato (88,5%) em mosto fermentado nas condições de pH 4,5 e 25°C, enquanto que Gomes *et al.* (2015) também constataram 80% de consumo de substrato na fermentação de mosto de mel para produção de hidromel doce. Estes autores, bem como Pereira *et al.* (2009) observaram um consumo simultâneo da glicose e frutose, assim como aconteceu no presente trabalho. Pereira *et al.* (2013) relataram também um consumo de substrato similar (aproximadamente 82%) com o uso de duas cepas de *S. cerevisiae* (Lalvin QA23 e Lalvin ICV D47) em mostos com 37% m/v de mel, fermentados a 25°C, por 96 h.

As concentrações de glicerol durante a fermentação dos mostos de mel do mesmo experimento podem ser visualizadas no gráfico da Figura 18, a seguir.

**Figura 18:** Perfis das concentrações de glicerol durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi.



Fonte: O autor.

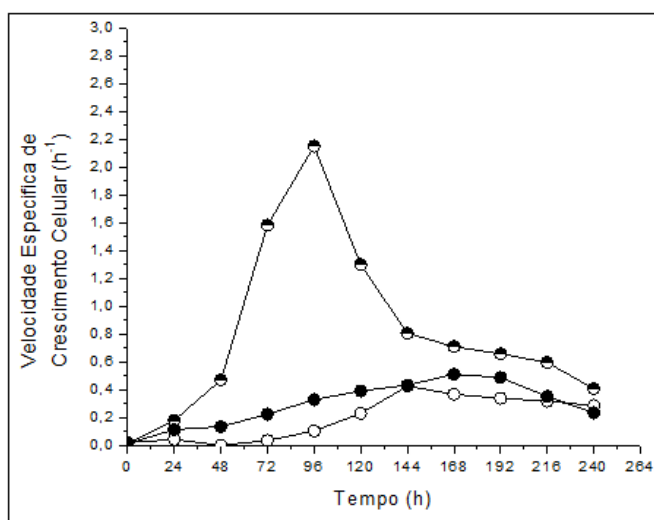
Pode-se observar que quanto maior a concentração de extrato de feijão-caupi utilizado na suplementação dos mostos de mel para a produção de hidromel, maiores foram os teores de glicerol produzidos ao longo da fermentação (Figura 18), sendo que as concentrações desta substância foram iguais a 8,0, 9,3 e 11,0 g.L<sup>-1</sup>, para os mostos com 0, 5 e 30 g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão-caupi, respectivamente, após 240 h de fermentação.

Czabaj *et al.* (2017) obtiveram, em hidroméis, concentrações similares de glicerol ( $7,41 - 9,45 \text{ g.L}^{-1}$ ) às verificadas no presente trabalho e os mesmos autores mencionaram que estes valores são normalmente encontrados em diversos tipos de hidroméis. No entanto, Gomes *et al.* (2015) reportaram valores inferiores de glicerol para hidroméis “doces” ( $5,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e “secos” ( $5,96 \text{ g.L}^{-1}$ ) após 79 h e 198 h de fermentação de mostos de mel, respectivamente. Pereira *et al.* (2009) também relataram valor inferior de concentração de glicerol ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) nos tempos finais de fermentação (192 – 312 h) para três cepas de *S. cerevisiae* testadas na produção de hidromel a partir da fermentação de mosto de méis claro e escuro a  $27^\circ\text{C}$ .

### 5.3.1.2. Cinética da fermentação

Nas Figura 19 e 20 estão expostas as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_x$ ) durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com extrato de feijão caupi.

**Figura 19:** Perfis das velocidades específicas de crescimento celular durante a fermentação mostos de mel suplementados 0 ( $\circ$ ), 5 ( $\bullet$ ) e 30 ( $\blacklozenge$ )  $\text{g.L}^{-1}$  de extrato de feijão-caupi.



Fonte: O autor.

Os valores de  $\mu_x$  foram superiores, durante todo o período fermentativo, nos mostos contendo  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de feijão-caupi, chegando a um valor máximo de  $2,15 \text{ h}^{-1}$  após 96 h de fermentação, enquanto que os mostos suplementados com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  apresentaram valores maiores deste parâmetro cinético em relação aos mostos sem a adição do referido extrato, com exceção do tempo equivalente a 240 h de fermentação, sendo que os valores máximos de  $\mu_x$  encontrados para os mostos sem e com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato foram iguais a  $0,42$  e  $0,51 \text{ h}^{-1}$ , após 144 e 168 h de fermentação, respectivamente (Figura 19).

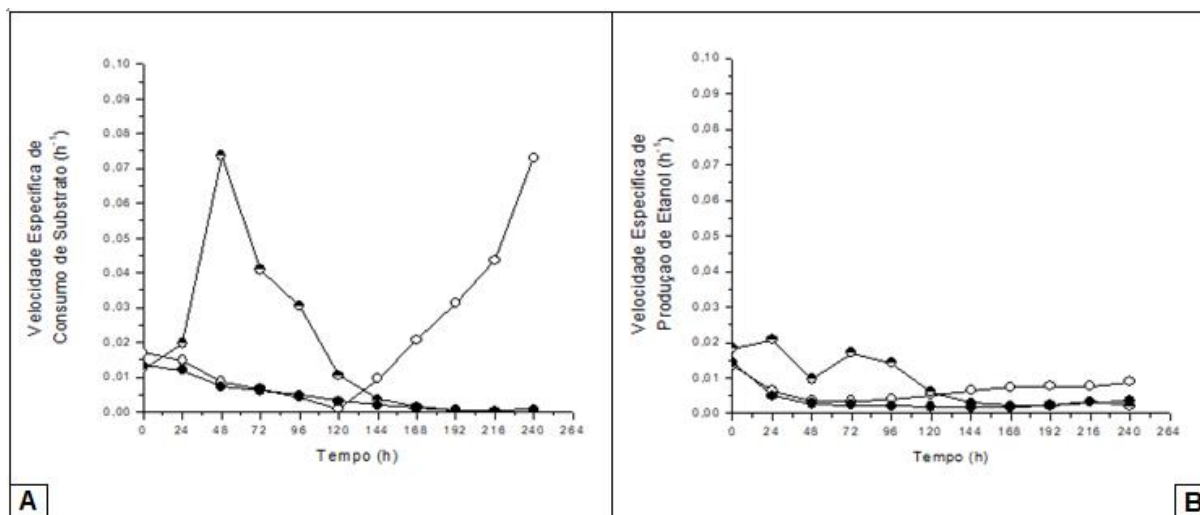
Sendo assim, diante do exposto, a adição de extrato de feijão-caupi aparentemente exerceu influência forte sobre os valores de  $\mu_x$  apenas nos mostos suplementados com baixa concentração ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Pereira *et al.* (2013) reportaram valores de  $\mu_x$  iguais a  $0,15$  e  $0,16 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, após 96 h de fermentação de mosto de mel para a produção de hidromel, utilizando duas cepas de *S. cerevisiae* (IVC D47 e QA23).

Valores similares deste parâmetro cinético ( $0,14$  e  $0,22 \text{ h}^{-1}$ ) foram reportados por Barbosa *et al.* (2014) para duas cepas de *S. cerevisiae* utilizadas na produção de vinho obtido a partir de mostos de suco de uva sintético, suplementados com  $67$  e  $670 \text{ mg.L}^{-1}$  de fosfato de amônio bibásico como fonte de nitrogênio, sendo que, assim como no presente trabalho, os mesmos autores também relataram que a diferença da concentração de fonte de nitrogênio nos mostos não altera os valores máximos da velocidade específica de crescimento celular.

Na Figura 20, a seguir, estão expostas as velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produção de etanol ( $\mu_P$ ) durante a fermentação dos mostos de mel suplementados com extrato de feijão caupi.

**Figura 20:** Perfis das velocidades específicas de consumo de substrato (A) e de produção de etanol (B), durante a fermentação mostos de mel suplementados  $0$  ( $\circ$ ),  $5$  ( $\bullet$ ) e  $30$  ( $\blacklozenge$ )  $\text{g.L}^{-1}$  de extrato de feijão-caupi.



Fonte: O autor.

Com relação aos valores de  $\mu_s$  (Figura 20-A) nos mostos de mel suplementados com o extrato de feijão-caupi, das 24 às 120 h após o início da fermentação, os mostos com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  do extrato apresentaram maiores valores desse parâmetro cinético em relação aos demais mostos, sendo que, após 48 h de fermentação, atingiu-se o maior valor de  $\mu_s$  ( $0,074 \text{ h}^{-1}$ ) e,

após isso, houve uma queda vertiginosa dos valores do referido parâmetro até o tempo de 144 h.

Os mostos sem suplementação apresentaram decréscimos nos valores de  $\mu_S$  até 120 h após o início da fermentação sendo que, após esse tempo, os valores apresentaram aumentos vertiginosos até atingir seu valor máximo ( $0,073 \text{ h}^{-1}$ ), após 240 h de fermentação. Os valores de  $\mu_S$  para os mostos com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato apresentaram decréscimo durante quase todo o período fermentativo, com uma certa estabilização após 192 h de fermentação.

A respeito dos valores de  $\mu_P$  (Figura 20-B) nos mostos de mel suplementados com extrato de feijão-caupi, ao contrário do que ocorreu com os valores de  $\mu_X$  e  $\mu_S$ , não foram constatados aumentos ou decréscimos vertiginosos deste parâmetro durante a fermentação. Os mostos suplementados com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  do extrato apresentaram os maiores os valores deste parâmetro cinético até 120 h de fermentação, sendo que o maior valor ( $0,021 \text{ h}^{-1}$ ) foi encontrado após 24 h de fermentação.

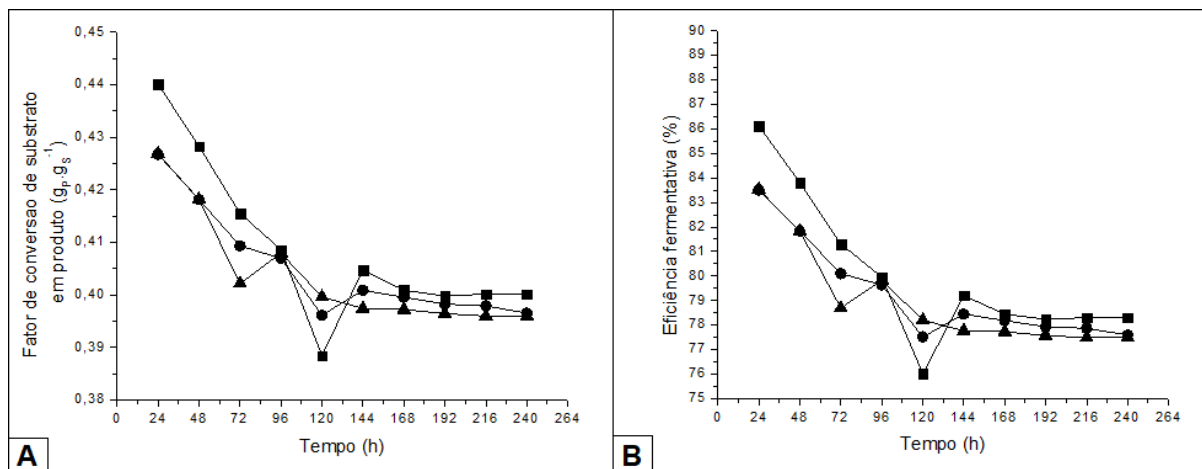
A partir de 144 h, os mostos sem adição do extrato apresentaram os maiores valores de  $\mu_P$  em relação aos demais mostos. Os mostos contendo  $30 \text{ g.L}^{-1}$  do extrato de feijão-caupi apresentaram o maior valor de  $\mu_P$  no início da fermentação (0 h, com  $\mu_P$  igual a  $0,014 \text{ h}^{-1}$ ), com leve redução até o tempo de 72 h e, a partir daí, os mesmos se mostraram relativamente estáveis.

A suplementação com o extrato de feijão-caupi promoveu maiores valores de  $\mu_S$  e  $\mu_P$  (Figuras 20-A e 20-B) nas primeiras 120 h de fermentação e, após esse tempo, os maiores valores destes parâmetros cinéticos foram registrados nos mostos de mel sem suplementação com extrato. Isto indica que a variação na concentração do extrato de feijão-caupi adicionado aos mostos aparentemente não exerceu efeito evidente sobre as velocidades específicas de consumo de substrato e de produção de etanol.

Os valores do fator de conversão de substrato em produto ( $\gamma_{P/S}$ ), eficiência fermentativa ( $\epsilon_f$ ) e produtividade volumétrica durante a fermentação se encontram nas Figuras 21 e 22.

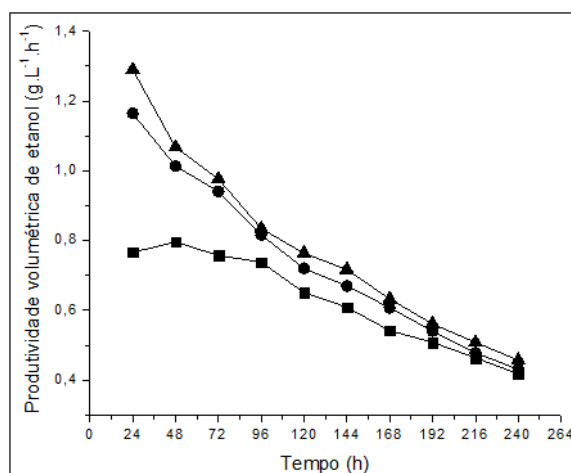


**Figura 21:** Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A) e da eficiência fermentativa (B) durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi.



Fonte: O autor.

**Figura 22:** Perfis da produtividade volumétrica de etanol durante a fermentação mostos de mel suplementados com 0 (■), 5 (●) e 30 (▲) g.L<sup>-1</sup> de extrato de feijão caupi.



Fonte: O autor.

Durante as fermentações, os valores de  $\gamma_{P/S}$  variaram de 0,388 a 0,440 g<sub>p</sub>.g<sub>s</sub><sup>-1</sup>, e os valores de  $\epsilon_f$  variaram de 76,0 a 86,1%, para os mostos sem adição do extrato de feijão-caupi, enquanto que, para os mostos suplementados com 5 e 30 g.L<sup>-1</sup> deste extrato, os valores  $\gamma_{P/S}$  variaram de 0,396 a 0,427 g<sub>p</sub>.g<sub>s</sub><sup>-1</sup>, e os valores de  $E_f$  de 77,5 a 83,1%, em ambos os tipos de mostos, como pode ser observado nas Figuras 21-A e 21-B.

Durante todo o período fermentativo, os valores de  $Q_P$  (Figura 22) se mostraram maiores nos mostos contendo 30 g.L<sup>-1</sup> do extrato de feijão-caupi, e os menores valores deste parâmetro ocorreram nos mostos sem a suplementação com este extrato. Isto era esperado visto que, durante as fermentações, os teores de etanol se apresentaram maiores à medida que as concentrações do extrato de feijão-caupi eram maiores no mosto e, visto que os valores de

$Q_P$  são diretamente proporcionais aos teores de etanol visto que, conforme Ilha *et al.* (2008),  $Q_P$  equivale à razão entre a concentração de etanol, em  $\text{g.L}^{-1}$ , e o tempo de fermentação em h.

Martínez, Vivas e Quicazán (2016) reportaram valores de  $Q_P$  (0,19 e 0,27  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) inferiores aos encontrados no presente trabalho, empregando leveduras imobilizadas e livres em mosto a 24 °Brix e 30°C, após 480 e 288 h de cultivo, respectivamente. Os mesmos autores encontraram valores de  $\gamma_{P/S}$  iguais a 0,40 e 0,36  $\text{gP.gS}^{-1}$ , para os mostos de mel fermentados em 480 e 288 h, respectivamente, enquanto que os valores de  $E_f$ , nas mesmas condições foram iguais a 78,14 e 70,80%, respectivamente.

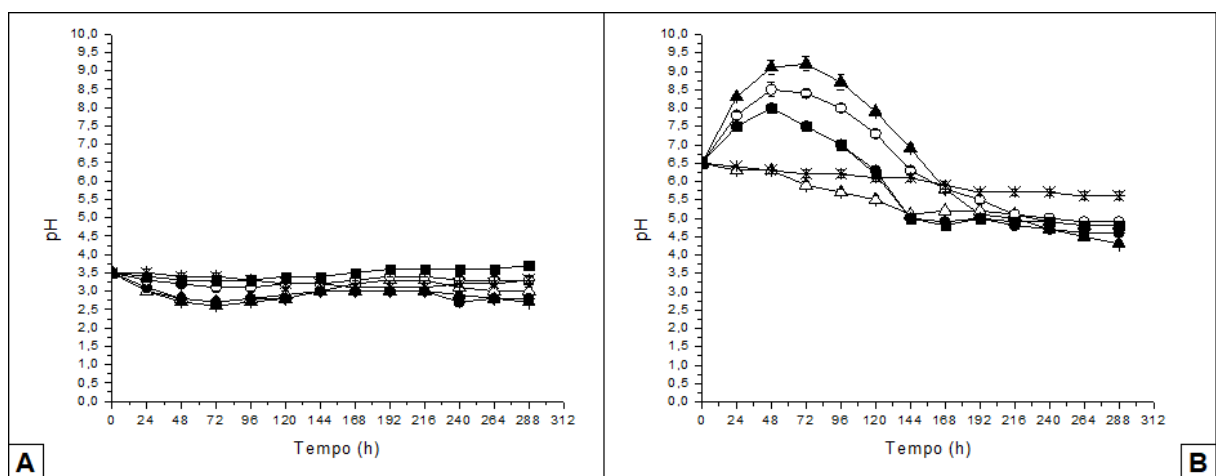
Entretanto, Qureshi *et al.* (1987) encontraram um valor bem superior de produtividade volumétrica em etanol (23,1  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), em comparação aos encontrados no presente trabalho, em hidromel empregando leveduras imobilizadas de *Hansenula anomala* em reator de bancada e mosto de mel a pH 4,5 e temperatura entre 27 a 35°C após 110 dias de cultivo.

### 5.3.2. Avaliação do efeito da concentração de graviola, da fibra deste fruto e do pH inicial

#### 5.3.2.1. Comportamento do pH dos mostos

As Figuras 23 e 24, a seguir, apresentam a variação do pH dos mostos de mel suplementados com graviola, conforme condições do planejamento experimental descrito nas Tabelas 9 a 11.

**Figura 23:** Perfis dos valores de pH nos mostos de mel com pH inicial 3,5 (A) e 6,5 (B), sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○)), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●), 20% m/v (■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

Nos mostos de mel com pH inicial igual a 3,5 (Figura 23-A), os valores de pH, ao decorrer do processo fermentativo, se mantiveram próximos aos valores iniciais, sem aumentos ou diminuições intensas. Em quase todos os mostos o pH decresceu durante o período fermentativo, com pequenos aumentos e estabilizações, exceto no caso do mosto com 20% m/v de graviola (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) cujo pH final (3,7, após 240 h de fermentação) foi maior do que o inicial.

Neste mesmo mosto, partir das 120 h de fermentação, os valores de pH se mostraram maiores do que nos outros mostos fermentados com pH inicial igual a 3,5. Neste mesmo grupo de mostos, o menor valor de pH registrado foi igual a 2,6, após 72 h de fermentação utilizando 30% m/v de graviola, sob a forma de polpa líquida (50% m/m) e porção fibrosa (50% m/m), sendo que este mesmo mosto registrou o menor valor de pH ao final da fermentação (2,7, após 288 h).

Pereira *et al.* (2015) realizaram a fermentação de mostos de mel, com valores de pH próximos a 3,5 (mais especificamente entre 3,67 e 3,78), suplementados com sais (fosfato de potássio, sulfato de magnésio e cloreto de cálcio) e vitaminas do complexo B e, após 288 h de fermentação, obtiveram hidroméis com valores de pH um pouco menores do que os iniciais (entre 3,55 e 3,68).

Mendes Ferreira *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes ao conduzirem as fermentações com mostos de mel com valores iniciais de pH entre 3,50 e 3,68, utilizando ácido málico, tartarato de potássio e fosfato de amônio dibásico como suplementos e, a após períodos que variaram entre 250 a 600 h de fermentação, obtiveram hidroméis com valores de pH um pouco menores do que os iniciais, mais especificamente entre 3,27 e 3,44. Nestes mesmos mostos, os valores de pH reduziram nos dias iniciais de fermentação e posteriormente se mantiveram estáveis durante quase todo o processo fermentativo, ocorrendo pequenos aumentos de pH nos dias finais das fermentações.

Nos mostos de mel com pH inicial igual a 6,5 (Figura 23-B), na maioria dos mesmos (com exceção do mosto sem adição de graviola e no que houve a adição deste fruto na concentração de 30% m/m, sob a forma de polpa líquida pura) os valores de pH aumentaram até 48 – 72 h do início de fermentação, atingindo valores entre 8,0 e 9,2 (no caso do mosto com 30% m/v de graviola, destes sendo 50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa). Posteriormente, os valores de pH diminuíram até se estabilizarem em valores próximos a 5,0, em tempos entre 144 h (nos mostos com 10 e 20% m/v de graviola, ambos sob a forma de polpa líquida e porção fibrosa nas concentrações de 50% m/m) e 216 h (para os mostos com 10% m/v de graviola sob a forma de polpa líquida pura).

O mosto de mel contendo 30% m/v de polpa líquida pura, cujo pH inicial foi 6,5, apresentou decréscimo de pH durante grande parte do processo fermentativo, se estabilizando em valores próximos a 5,0 após 144 h de fermentação. No ensaio controle (sem adição de graviola), com pH inicial igual a 5,0, os valores deste parâmetro decresceram lentamente até 144 h de fermentação, com uma redução um pouco mais acentuada dos valores de pH, até 192 h onde os mesmos se estabilizaram em valores entre 5,6 e 6,0.

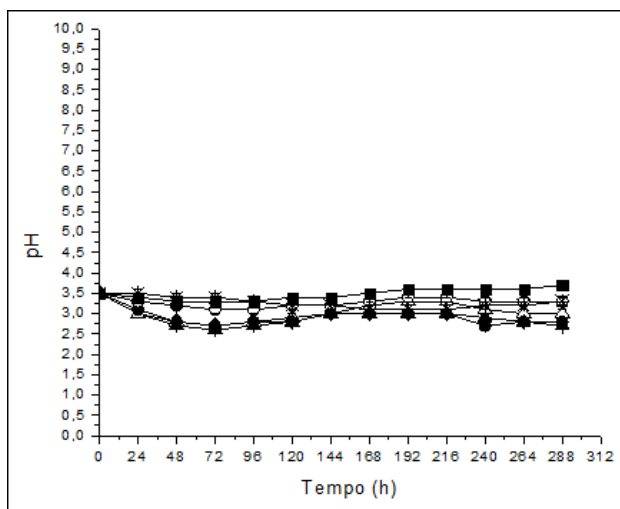
Os valores finais de pH nos mostos com pH inicial igual a 6,5 variaram entre 4,3 (para o mosto suplementado com 30% m/v de graviola, com 50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) até 5,6 (para os ensaios sem adição de graviola).

A variação da concentração de graviola exerceu uma maior influência na variação dos valores de pH dos mostos com pH inicial igual a 6,5 do que nos mostos com valor inicial deste parâmetro igual a 3,5 (Figura 23). Nos mostos com maior pH inicial (6,5) a variação da concentração de porção fibrosa na polpa da graviola influenciou no tempo em que os valores de pH demoraram para se estabilizar nos mostos. Geralmente os mostos com polpa de graviola com maiores percentuais de porção fibrosa apresentaram estabilização dos valores de pH em tempos menores do que aqueles cuja graviola estava somente sobre a forma de polpa líquida.

Os ensaios com 10 e 20% m/v (ambos com 50% m/m tanto de polpa líquida quanto de porção fibrosa), ambos com pH inicial igual a 6,5, apresentaram valores praticamente idênticos de pH durante todo o processo fermentativo, indicando que, neste caso específico, a variação na concentração de graviola não provocou efeitos evidentes sobre os valores de pH.

A variação dos valores de pH dos mostos de mel, suplementados com graviola, com pH inicial 5,0 então mostrados na Figura 24, a seguir.

**Figura 24:** Perfis de pH nos mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa(■), (◻) e (◼)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

Nos mostos de mel, suplementados com graviola, cujo pH inicial foi igual a 5,0, (Figura 24), os valores de pH se mantiveram próximos (entre 4,7 e 5,1), durante a maior parte do processo fermentativo, em quase todos os ensaios. No ensaio contendo 30% m/v (com 75% m/m de polpa líquida e 25% m/m) com exceção do ensaio controle (sem adição de graviola), cujos valores de pH se mostraram inferiores aos dos demais mostos durante quase todo o processo fermentativo, alcançando um valor final igual a 4,3 após 288 h de fermentação.

Em nenhum desses ensaios foram verificados declínios ou aumentos abruptos de pH e, em comparação aos mostos de mel suplementados com graviola que começaram as fermentações com valores iniciais de pH iguais a 3,5 e 6,5, houve uma maior estabilidade nos valores deste parâmetro ao longo do período de fermentação.

Mendes-Ferreira *et al.* (2010) na fermentação de mostos de mel (TSS inicial igual a 22,0 °Brix) com valores iniciais iguais a 4,72 obtiveram hidroméis com pH, igual a 3,64, valor esse bastante inferior aos obtidos no presente trabalho com os mostos de mel que iniciaram seus processos fermentativos com pH igual 5,0. Porém, ao contrário do acontecido neste trabalho, Mendes-Ferreira *et al.* (2010) não fizeram uso de polpa de fruta, apenas ácido málico, tartarato de potássio e fosfato de amônio bibásico.

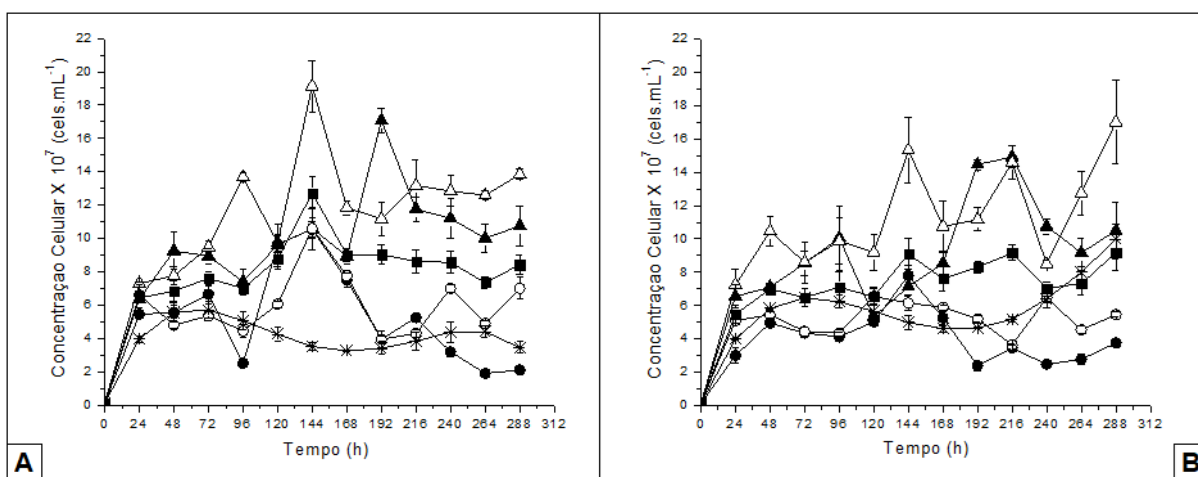
A realidade apresentada acima pode ser um indicativo que o uso de polpas de fruta, especialmente as fibrosas como a graviola, podem exercer um efeito estabilizador no pH de

mostos com valores iniciais igual a 5,0, mas sem a adição de graviola, apresentaram menor estabilidade do pH.

### 5.3.2.2. Perfis das concentrações celulares, concentrações de açúcares e de etanol

Os perfis das concentrações celulares de leveduras durante as fermentações dos ensaios descritos nas Tabelas 9 a 11, estão apresentados nas Figuras 25 e 26, a seguir.

**Figura 25:** Perfis das concentrações celulares das leveduras nos mostos de mel com pH inicial 3,5 (A) e 6,5 (B), sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

A adição de graviola tanto nos mostos de mel com pH inicial 3,5 (Figura 25-A), quanto naqueles cujos valores iniciais deste parâmetro eram iguais a 6,5 (Figura 25-B), estimulou o crescimento da população de leveduras. Os maiores valores encontrados de concentração celular foram nos mostos com 30% m/v de graviola, sendo que, dentre estes, na maior parte do período fermentativo (principalmente nos mostos com pH inicial igual a 6,5) os mostos em que a polpa de graviola estava sob a forma de polpa líquida pura apresentaram os maiores valores de concentração celular.

Os mostos com 20% m/v de graviola (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa), com pH inicial 3,5 e 6,5, apresentaram, durante a maior parte do tempo, valores de concentração celular inferiores aos encontrados nos mostos com 30% m/m deste fruto, porém superiores aos que ocorreram nas fermentações contendo 10% m/m ou mesmo sem a adição deste fruto.

As concentrações celulares nos mostos suplementados com graviola apresentaram-se irregulares ao longo dos processos fermentativos, com sucessivos aumentos e decréscimos em curtos intervalos de tempo. Já, no caso dos ensaios controle (sem adição de graviola), os valores da concentração celular, tanto nos mostos com pH inicial 3,5 e com 6,5, se apresentaram mais harmônicos, sem quedas e decréscimos abruptos.

Para os mostos com pH inicial igual a 3,5, após 24 h de fermentação, o crescimento celular aumentou de 28,2 a 58,1 vezes o valor inicial, nos ensaios sem e com 30% m/v de graviola sob a forma de polpa líquida pura, respectivamente, sendo que neste último foi registrado o maior valor de concentração celular ( $1,91 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, após 144 h de fermentação) dentre os mostos com pH inicial 3,5. Os valores finais das concentrações celulares nestes mostos variaram de  $3,4 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos referentes aos ensaios controle, até  $1,38 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos com 30% m/v de graviola sob a forma de polpa líquida pura. Isto poderia ser um indicativo de que os nutrientes contidos na polpa de graviola favoreceram o crescimento celular.

Na fermentação de mostos com valores iniciais de pH entre 3,50 e 3,68 (com TSS iniciais entre 22,2 e 22,3°Brix, fermentados a 22°C), Mendes-Ferreira *et al.* (2010) reportaram valores finais (após 250 – 600 h de fermentação) de concentração celular variando de  $1,6 \times 10^7$  a  $2,8 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, valores esses inferiores aos encontrados no presente trabalho, porém com a ressalva de que a concentração inicial de células viáveis das fermentações realizadas por estes autores (aproximadamente  $10^5$  cels.mL<sup>-1</sup>) foram aproximadamente 10 vezes menores do que as usadas no presente trabalho (cerca de  $10^6$  cels.mL<sup>-1</sup>).

Pereira *et al.* (2015), em mostos de mel com valores iniciais de pH entre 3,67 e 3,78, suplementados com sais e algumas vitaminas do complexo B, obtiveram valores finais de concentração de leveduras aproximadamente iguais a  $5 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup> após 288 h de fermentação. Considerando que o tempo de fermentação foi igual ao utilizado no presente trabalho, para os mostos de mel suplementados com graviola, os valores de concentração celular final apresentaram-se maiores do que os menores valores deste parâmetro encontrados neste trabalho ( $3,4 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>), porém bem menores do que os valores máximos encontrados ( $1,38 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>).

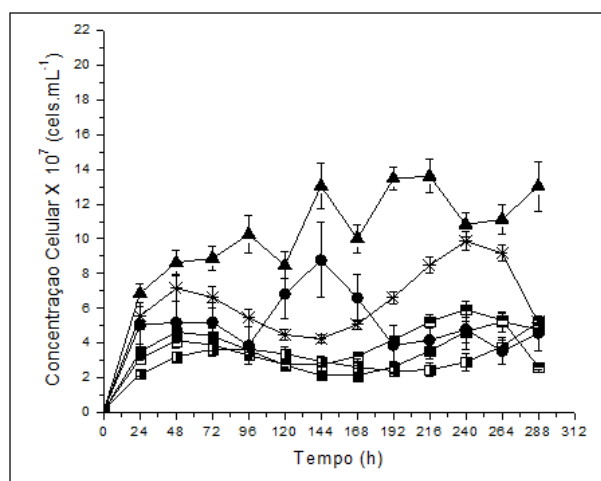
Entretanto os mostos de mel referentes ao trabalho de Pereira *et al.* (2015) possuíam a mesma concentração inicial celular aproximada ( $10^5$  cels.mL<sup>-1</sup>) dos mostos fermentados por Mendes-Ferreira *et al.* (2010), ou seja, também 10 vezes menores do que as utilizadas no presente trabalho, poderia indicar que a suplementação com sais e vitaminas do complexo B,

em alguns casos, pode ser tão eficiente quanto a adição de graviola para a estimulação do crescimento de populações de leveduras do gênero *Saccharomyces* em mostos de mel.

O aumento das concentrações celulares nos mostos com pH inicial igual a 6,5, após 24 h de fermentação foi 23,2 e 65,9 vezes o valor inicial, para os ensaios com 10% m/v de graviola (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) e com 30% m/v de graviola sob a forma de polpa líquida pura, respectivamente, sendo que neste último foi registrado o maior valor de concentração celular ( $1,7 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>), após 288 h de fermentação dentre os mostos com pH inicial 6,5.

Os valores finais das concentrações celulares nestes mostos variaram de  $3,8 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos com 10% m/v de graviola (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa), até  $1,7 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos com 30% m/v de graviola sob a forma de polpa líquida pura. Isto poderia indicar que a concentração de 10% m/v de graviola sob a forma de mistura de polpa líquida (50% m/m) e porção fibrosa (50% m/m) foi a que melhor favoreceu o crescimento celular nos mostos com pH inicial 6,5.

**Figura 26:** Perfis das concentrações celulares das leveduras nos mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (□) e (▣)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

Nos mostos de mel, suplementados com graviola, com pH inicial 5,0 (Figura 26), o aumento da concentração de graviola não estimulou o crescimento celular da mesma forma que nos mostos com valores iniciais de pH iguais a 3,5 e 6,5, visto que apenas os mostos suplementados com 30% m/v (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) nitidamente apresentaram os maiores valores deste parâmetro durante todo o período



fermentativo, alcançando um valor máximo de  $1,36 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, após 216 h de fermentação, enquanto não houve uma predominância de valores maiores de concentrações celulares em mostos com concentrações maiores de graviola.

A situação exposta acima é comprovada devido ao fato de que os mostos sem adição de graviola apresentaram os maiores valores (abaixo dos encontrados para os mostos com 30% m/v deste fruto) de concentração celular na maior parte do período de fermentação, exceto nos tempos de 120 a 168 h, intervalo onde as concentrações celulares nos mostos contendo 10% m/m (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) de graviola se apresentaram maiores do que nos mostos sem adição deste fruto.

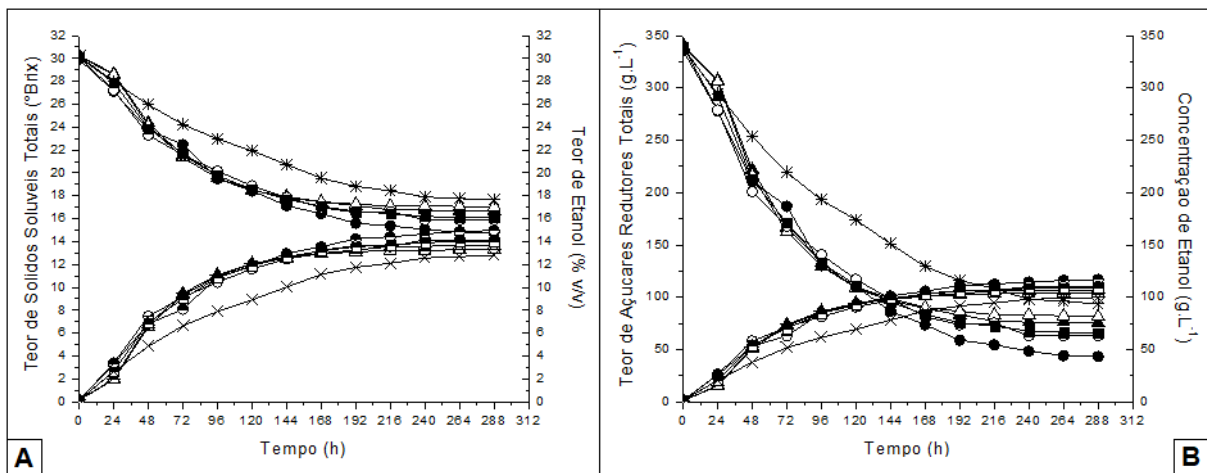
Os três ensaios com mesmo valor de pH inicial (5,0) e de concentração de graviola (20% m/v, destes 75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa), referentes aos ensaios 9 a 11 descritos na Tabela 9, apesar de apresentar valores de concentração celular próximos durante as primeiras 144 h de fermentação, apresentaram aumento na discrepância entre esses valores a partir de 168 h, indicando que, neste caso específico, não houve um comportamento similar das concentrações celulares nas mesmas condições de fermentação.

Nos mostos com pH inicial igual a 5,0, após 24 h de fermentação, o crescimento celular aumentou em 14,9 e 57,8 vezes o valor inicial, para os ensaios com 20% m/v (75% m/m de polpa líquida e 25 % de porção fibrosa) de graviola e com 30% m/v de graviola (75% m/m de polpa líquida e 25 % de porção fibrosa), respectivamente. Os valores finais das concentrações celulares nestes mostos variaram de  $2,7 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos referentes aos ensaios com 20% m/v (75% m/m de polpa líquida e 25 % de porção fibrosa) de graviola, até  $1,3 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, nos mostos com 30% m/v do referido fruto (75% m/m de polpa líquida e 25 % de porção fibrosa).

Na fermentação de mostos de mel (28 a 32°Brix) suplementados com polpa de acerola (0 a 25% m/v), com pH inicial igual a 5,0, Amorim *et al.* (2018) reportaram valores finais de concentração de *Saccharomyces cerevisiae* AWRI entre  $1,0 \times 10^8$  e  $2,5 \times 10^8$  cels.mL<sup>-1</sup>, após 288 h de fermentação, a 30°C. Estes valores são, em sua maioria, maiores do que os valores finais de concentração celular obtidos no presente trabalho, porém as concentrações celulares iniciais nos mostos referentes ao trabalho de Amorim *et al.* (2018) foram muito superiores (cerca de 10 a 50 vezes) às reportadas no presente trabalho (aproximadamente  $10^6$  cels.mL<sup>-1</sup>), indicando assim que a levedura comercial *S. bayannus* Premier Cuvée, da Red Star®, pode apresentar potencial de crescimento celular similar ou até maior do que as levedura comercial *S. cerevisiae* AWRI, em mostos de mel suplementados com polpas de fruta.

As Figuras 27 a 29 apresentam os perfis de consumo de substrato, expressos pela redução dos valores de TSS e de açúcares reductores totais, bem como os de produção de etanol (em % v/v, e em g.L<sup>-1</sup>) durante as fermentações.

**Figura 27:** Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares reductores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 3,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (o), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L<sup>-1</sup>, de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (3,5) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (⊖), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (⊕)), 20% m/v ((■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: o autor.

A adição da graviola claramente estimulou o consumo de substrato (açúcares) e a produção de etanol durante a fermentação dos mostos de mel com pH inicial igual a 3,5 (Figura 27), visto que, durante quase todo o período fermentativo (exceto no tempo de 24 h após o início da fermentação), os valores dos TSS e açúcares reductores totais nos mostos sem adição de graviola (ensaio controle) se mostraram superiores aos encontrados nos mostos suplementados com graviola, e os teores de etanol foram inferiores nos mostos dos ensaio controle em relação aos encontrados nos demais ensaios fermentativos.

Os mostos sem adição de graviola apresentaram, dentre aqueles cujo pH inicial foi igual a 3,5, menores percentuais de consumo de açúcares e de produção de etanol, ao longo das 288 h de fermentação, confirmando que a adição do fruto aos mostos de mel estimulou o consumo de açúcares e a produção de etanol.

Porém, nos mostos com a adição de graviola, aqueles com menor concentração deste fruto (10% m/v), apresentaram os maiores percentuais de consumo de açúcares e produção de etanol, sendo que, quanto maior a concentração de graviola adicionada aos mostos, menores foram os valores dos percentuais mencionados. Este fato poderia estar relacionado com que o aumento da concentração de polpa produziu uma diminuição da homogeneidade do meio de fermentação o que pode ter contribuído na diminuição do consumo dos açúcares, por parte das leveduras, para a produção de etanol.

A presença de fibra insolúvel na polpa de graviola adicionada aos mostos com 10 e 30% m/v de graviola (pH inicial 3,5) também intensificou o consumo de açúcares e a produção de etanol. Os maiores teores finais de etanol,  $(15,0 \pm 0,5)\%$  v/v e  $(116,8 \pm 3,7)$  g.L<sup>-1</sup>, após 288 h de fermentação, foram encontrados nos mostos de mel contendo 10% m/v de graviola (destes, 50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa). Isto pode ser um indicativo de que adição da fibra de graviola pode contribuir para a produção de altas concentrações de etanol, em mostos ácidos, sem *stress* das leveduras.

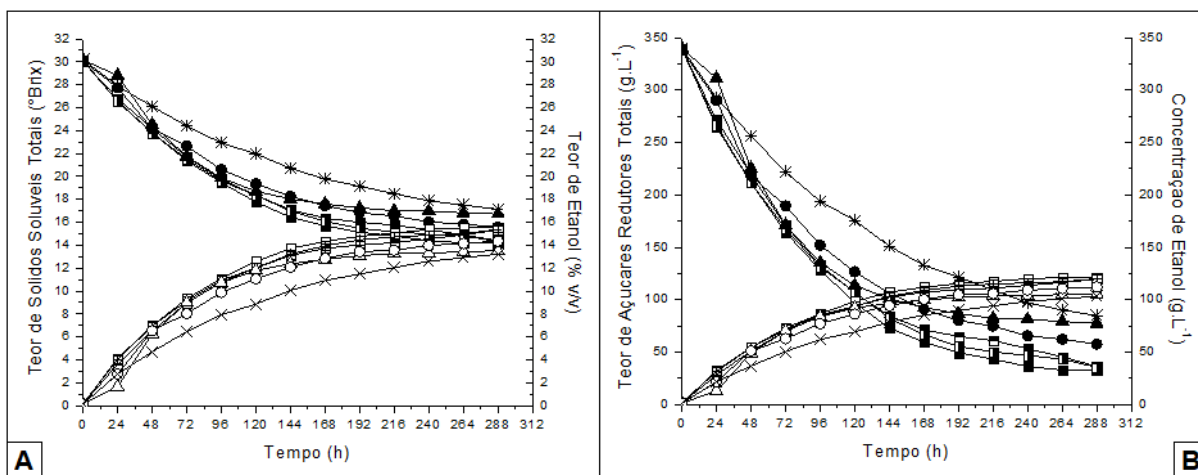
Pereira *et al.* (2009), em hidroméis oriundos da fermentação de mostos de mel, suplementados com pólen (0 a 50 g.L<sup>-1</sup>), com valores iniciais de pH entre 3,55 e 3,66 (e TSS totais iniciais entre 20 e 22°Brix), encontraram teores de etanol iguais a 9,04% v/v, nos mostos sem pólen, e entre 11,74 e 12,39% v/v, para os mostos suplementados com 10 e 50 g.L<sup>-1</sup> de pólen, respectivamente, indicando que, ao contrário do ocorrido no presente trabalho, o aumento da concentração do suplemento de origem vegetal estimulou a produção de etanol durante a fermentação.

Porém, as concentrações de pólen utilizadas por Pereira *et al.* (2009) foram inferiores às concentrações de graviola adicionadas aos mostos de mel referentes ao presente trabalho, onde além da presença da graviola foi adicionado extrato de feijão-caupi (30 g.L<sup>-1</sup>).

Mendes-Ferreira *et al.* (2010), na fermentação de mostos de mel (TSS iniciais entre 22,2 e 22,3°Brix) com pH inicial entre 3,50 e 3,68, após 250 a 600 h de fermentação, obtiveram hidroméis com 10,7 a 11,4% v/v de etanol. Estes valores foram inferiores aos encontrados no presente trabalho, para os mostos com pH inicial igual a 3,5, porém estes autores utilizaram ácidos orgânicos e sais nitrogenados para a suplementação dos mostos de mel. Isso é um indicativo de que a suplementação com polpas de frutas pode ser mais eficaz no estímulo das leveduras a consumirem açúcares e, por consequência, produzirem etanol durante a fermentação de mostos de mel.

A Figura 28, a seguir, apresenta os perfis de TSS, açúcares redutores totais e de etanol para os mostos com pH inicial 5,0.

**Figura 28:** Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares redutores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 5,0, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (□) e (▣)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L<sup>-1</sup>, de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (5,0) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (○)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (□), (▣) e (▢)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (Δ)).



Fonte: O autor.

Durante os ensaios fermentativos com pH inicial 5,0 (Figura 28), mais especificamente a partir das 48 h, os valores de TSS e açúcares totais dos mostos de mel sem adição de graviola (ensaio controle) foram superiores aos encontrados nos demais mostos, estes com adição de graviola.

Os mostos de mel referentes ao ensaio controle mencionado anteriormente, a partir das 48 h, também apresentaram teores de etanol inferiores aos encontrados nos mostos que foram suplementados com graviola, indicando que a adição de graviola estimulou o consumo de açúcares e a consequente produção de etanol nos mostos cujo pH inicial foi 5,0.

Nos mostos de mel com pH inicial 5,0, ao longo das 288 h de fermentação, o aumento da concentração de graviola estimulou o consumo de açúcares e a produção de etanol até a concentração de 20% m/v deste fruto, onde foram registrados os maiores teores de etanol,  $(15,5 \pm 0,3)\%$  m/v e  $(121,1 \pm 2,2)$  g.L<sup>-1</sup>, e os menores valores dos TSS,  $(14,2 \pm 0,4)$  °Brix, e açúcares redutores totais,  $(32,8 \pm 6,1)$  g.L<sup>-1</sup>.

Quando a concentração de graviola, nos mostos mencionados acima, com pH inicial 5,0, foi aumentada para 30% m/v, houve uma nítida diminuição tanto do consumo dos açúcares quanto da produção de etanol ao longo das 288 h de fermentação, sendo que os

teores finais de etanol se mostraram superiores apenas aos dos ensaios sem adição de graviola. Isso indica que a adição de graviola aos mostos de mel, com pH inicial 5,0, na concentração de 30% m/v de graviola não se mostrou tão eficaz quanto a adição deste fruto nas concentrações de 10 e 20% m/v, no que diz respeito a estimular as leveduras a metabolizar o substrato para a consequente produção de etanol.

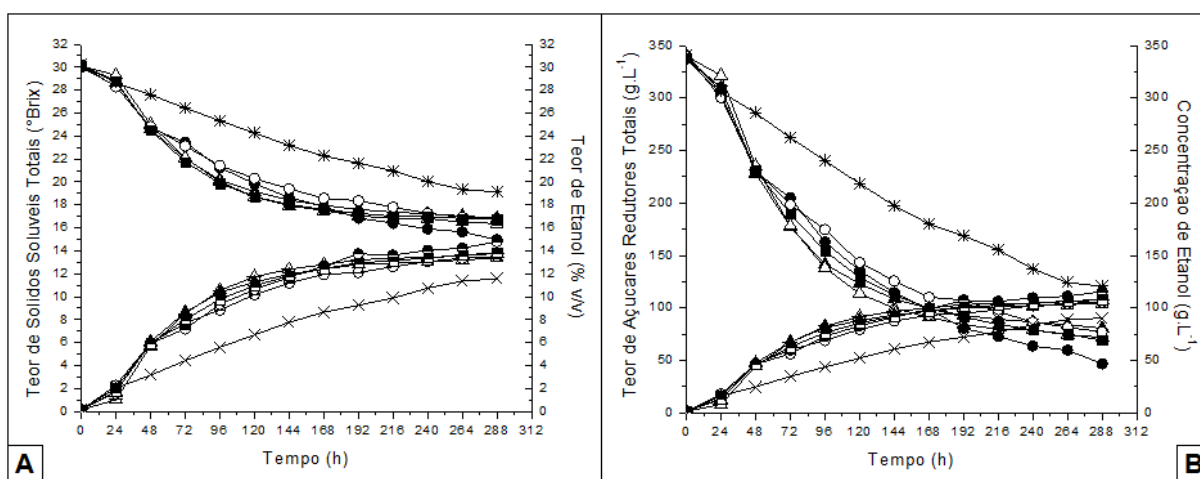
Assim como ocorrido no presente trabalho, Amorim *et al.* (2018) obtiveram, na fermentação de mostos de mel, com pH inicial igual a 5,0, suplementados com uma polpa de fruta (neste caso específico, a acerola, em concentrações de 0 a 30%) e suplementos comerciais como peptona e extratos de malte e de levedura, o estímulo do consumo de substrato e da produção de etanol nestes mostos, visto que, após 288 h de fermentação a 30°C, foram obtidos teores finais de etanol entre 116,2 g.L<sup>-1</sup> (14,2% v/v), para os mostos sem adição da acerola, e 127 g.L<sup>-1</sup> (16,6% v/v), para os mostos com 10% do mesmo fruto, sendo que estes mesmos mostos foram os que obtiveram o menor (49,1%, no caso dos mostos sem acerola) e o maior (58%, para os mostos com 10% de acerola) consumo de substrato.

Os teores finais de etanol obtidos na fermentação dos mostos de mel por Amorim *et al.* (2018) foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho, porém os consumos de substrato (49,1 a 58,0%) foram inferiores, indicando que houve um maior aproveitamento no consumo de substrato para a produção de etanol nos mostos contendo polpa de acerola.

Mendes-Ferreira *et al.* (2010), na fermentação de mostos de mel com pH inicial 4,72, obtiveram valores inferiores no que se refere aos teores finais de etanol (11,3% v/v) se comparados aos encontrados no presente trabalho, nos mostos com pH inicial igual a 5,0. Porém, estes autores utilizaram ácidos orgânicos e sais nitrogenados, ao invés de polpas de frutas, para suplementar os mostos de mel. Este fato é mais um indicativo de que a adição de polpas de fruta aos mostos de mel favorece o estímulo às leveduras ao consumo de açúcares e à subsequente produção de etanol.

Os perfis de TSS, açúcares redutores totais e de etanol para os mostos com pH inicial 6,5, são apresentados na Figura 29.

**Figura 29:** Perfis dos teores de sólidos solúveis totais (A), e das concentrações de açúcares redutores totais (B), para os mostos de mel com pH inicial 6,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)). Perfis dos teores, em % v/v, e das concentrações, em g.L<sup>-1</sup>, de etanol, para os mostos com o mesmo pH inicial (6,5) sem (X) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (⊖), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (⊙)), 20% m/v (■) mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

A adição de graviola aos mostos de mel, com valores iniciais de pH 6,5 (Figura 29), favoreceu o consumo de substrato (açúcares) e a produção de etanol durante as fermentações. A partir de 48 h os valores de TSS e de açúcares redutores totais se apresentaram maiores (e os teores de etanol menores) do que os encontrados nos mostos suplementados com graviola o que indica um menor consumo de substrato e por consequência, a menor produção de etanol.

O aumento da concentração de graviola, nos mostos de mel com pH inicial 6,5, só favoreceu o consumo de açúcares e a produção de etanol quando a mesma aumentou de 0 para 10% m/v e, no caso em que este fruto foi administrado sob a forma de polpa líquida pura, de 10 para 30% m/v.

Para os mostos em que a graviola foi administrada sob a forma de mistura de polpa líquida e porção fibrosa, o aumento da concentração deste fruto reduziu os percentuais de consumo de açúcares redutores, de 86,2% a  $78,9 \pm 6,8\%$ , bem como os de produção de etanol, de 10.400,0% a 9.372,7%.

Pode se verificar que nos mostos de mel com pH inicial 6,5, o mosto com graviola na concentração de 10% m/v (destes, 50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa)

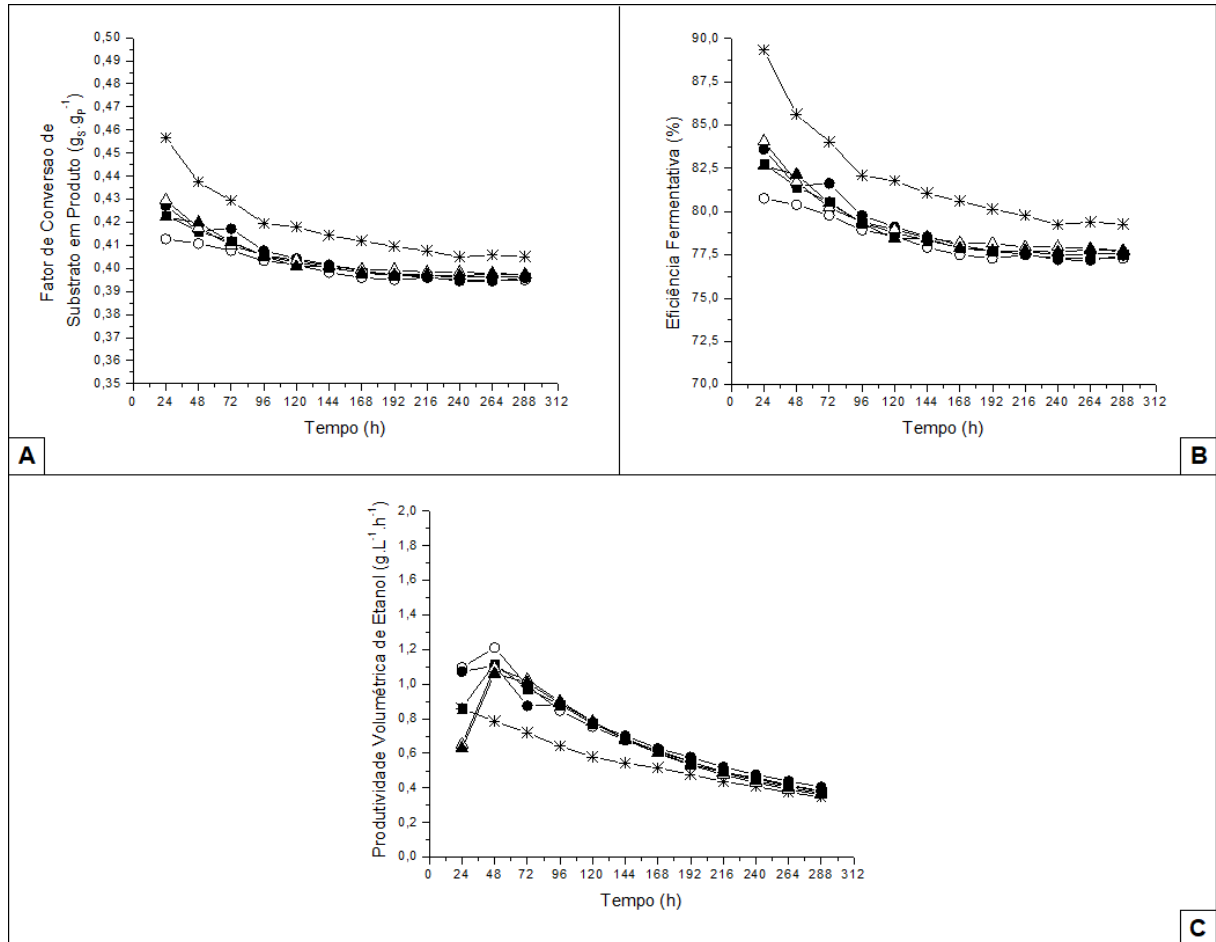
apresentou maiores valores de consumo de substrato e maior produção de etanol, com concentrações finais de etanol iguais a  $(14,8 \pm 0,3)\%$  m/v e  $(115,5 \pm 10,4)$  g.L<sup>-1</sup>, e de TSS e açúcares redutores totais iguais a  $(15,0 \pm 0,7)$  °Brix e  $(46,7 \pm 28,5)$  g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os ensaios com pH inicial 5,0 proporcionaram os maiores valores de consumo de açúcares redutores e de produção de etanol, sendo que os ensaios com 20% m/v de graviola (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa), correspondente à triplicata do ponto central do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> descrito na Tabela 9 (ensaios 9 a 11), foram os que apresentaram os valores máximos de consumo de açúcares redutores, 89,3% a 90,3%, e de produção de etanol, 10.763,6% a 9.372,7%.

O fato de que faixa de valores de pH ótimos para as leveduras do gênero *Saccharomyces* realizarem a fermentação ser entre 4,0 e 5,0 (LIMA *et al.*, 2001) provavelmente favoreceu o consumo de açúcares e a produção de etanol nos mostos cujo pH inicial foi igual a 5,0. Nestes mostos, quase sempre os valores de pH mantiveram-se dentro da faixa ótima mencionada anteriormente, como pode ser observado na Figura 24, fato não verificado nos mostos fermentados com valores iniciais de pH iguais a 3,5 e 6,5 (Figuras 23-A e 23-B).

Os perfis do fator de conversão de substrato em produto ( $\gamma_{P/S}$ ), eficiência fermentativa ( $\epsilon_f$ ) e produtividade volumétrica ( $Q_P$ ), durante as fermentações nas condições do planejamento fatorial se encontram nas Figuras 30 a 32, a seguir.

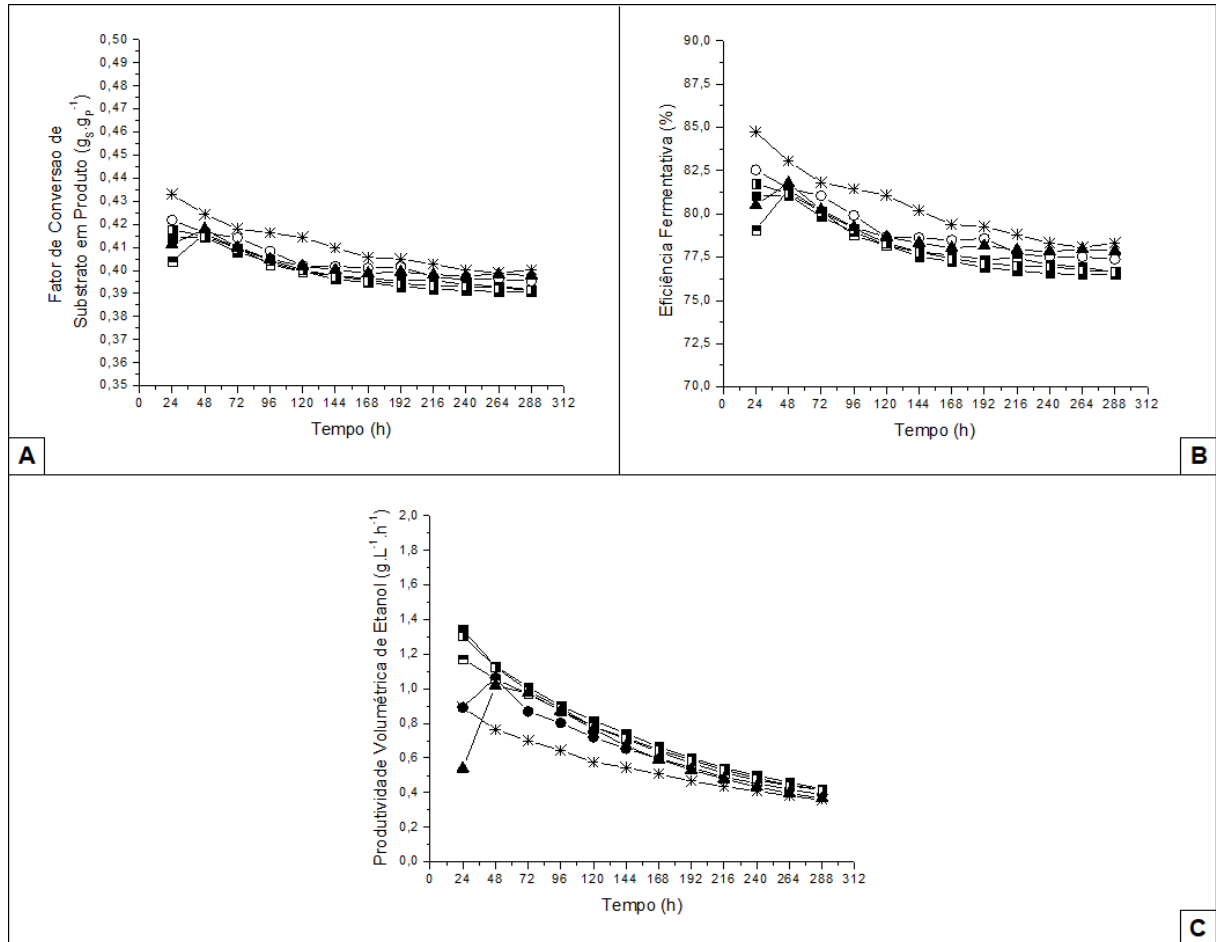
**Figura 30:** Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 3,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (Δ), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

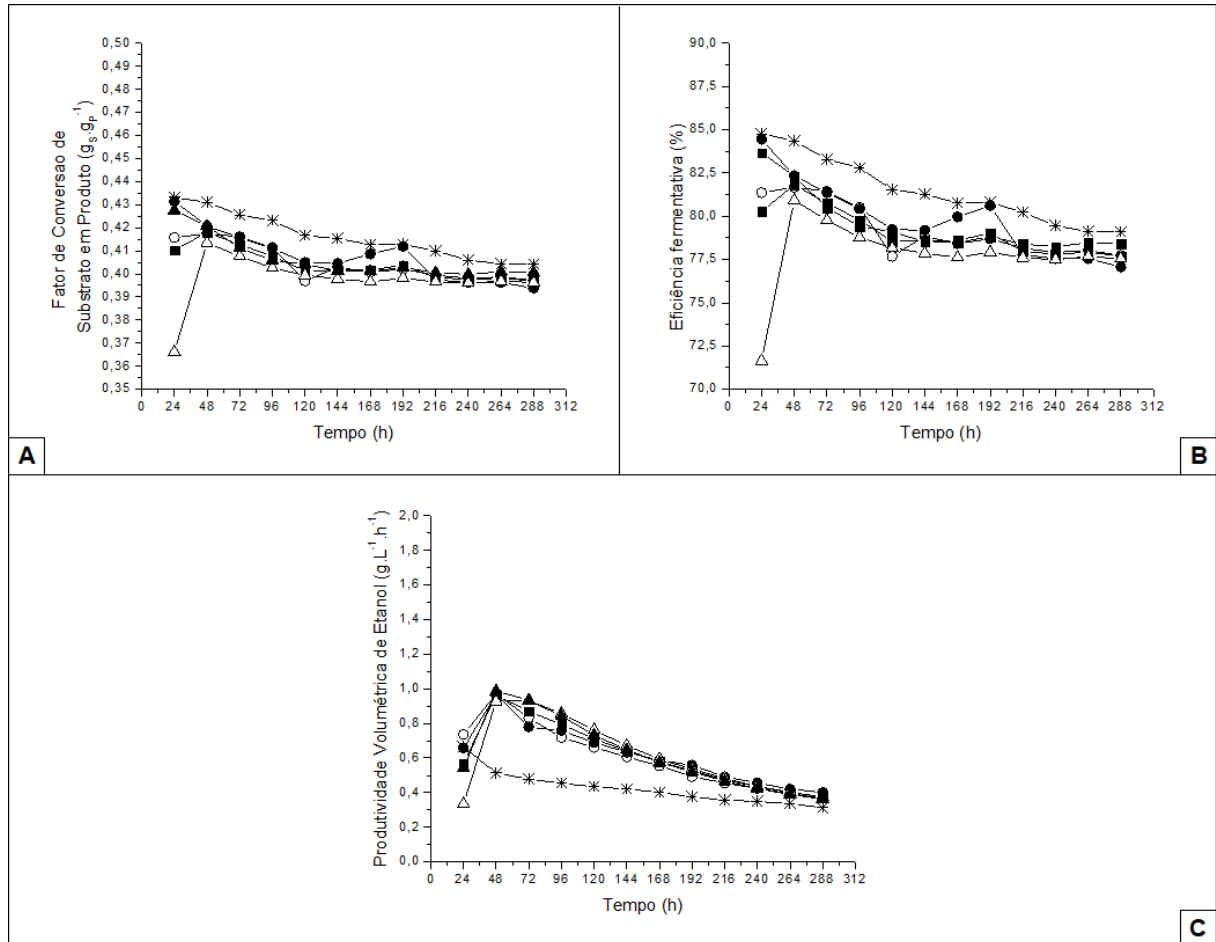


**Figura 31:** Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 5,0 sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■), (◻) e (◼)) e 30% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

**Figura 32:** Perfis do fator de conversão de substrato em produto (A), eficiência fermentativa (B) e da produtividade volumétrica de etanol (C), para os mostos de mel com pH inicial 6,5, sem (\*) e com adição de graviola nas concentrações de 10% m/v (polpa líquida pura (○), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (●)), 20% m/v (mistura de 75% de polpa líquida e 25% de porção fibrosa (■)) e 30% m/v (polpa líquida pura (△), ou mistura de 50% de polpa líquida e 50% de porção fibrosa (▲)).



Fonte: O autor.

Independentemente do pH inicial, os maiores valores de  $\gamma_{P/S}$  e de  $\varepsilon_f$ , durante todo o período fermentativo, foram encontrados nos mostos sem a adição de graviola. Nos demais mostos, os valores foram muito próximos durante o maior período de fermentação. Isso indica que, apesar dos mostos que não foram suplementados com graviola terem apresentado os menores teores de etanol durante quase todo o período de fermentação (Figuras 28 a 30), foi neles que os açúcares consumidos foram melhor aproveitados para a produção de etanol.

Ao final dos processos fermentativos (288 h) nos mostos de mel com pH inicial igual a 3,5, os valores de  $\gamma_{P/S}$  variaram de 0,395 a 0,405  $g_P \cdot g_S^{-1}$ , e os de  $E_f$  de 77,3 a 79,3%, especificamente para os mostos com 10% m/v de graviola (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) e nos mostos sem adição do referido fruto, respectivamente.

Nos mostos com pH inicial igual a 5,0, também após 288 h de fermentação, os valores de  $\gamma_{P/S}$  variaram de 0,390 a 0,400  $\text{g}_P.\text{g}_S^{-1}$ , e os de  $\epsilon_f$  de 76,5 a 78,3%, para os mostos com 20% m/v (75% de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) de graviola e nos mostos sem edição deste fruto, respectivamente. Já, nos mostos com pH inicial igual a 6,5, os valores variaram de 0,394 a 0,404  $\text{g}_S.\text{g}_P^{-1}$  ( $\gamma_{P/S}$ ), e de 77,1 a 79,1% ( $\epsilon_f$ ), após 288 h de fermentação, para os mostos com 10% m/v (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) e sem adição deste fruto, respectivamente.

Para todos os mostos de mel suplementados com graviola, além dos seus respectivos ensaios controle, quanto maior a produção de etanol (Figuras 27 a 29) em 288 h de fermentação, menores foram os valores de  $\epsilon_f$  e  $\gamma_{P/S}$  reportados, indicando que os mostos em que houve maior produção de etanol também foram aqueles cujos aproveitamentos dos açúcares redutores totais foi menor, pois, quanto maior a produção de etanol, maiores também foram as quantidades de açúcares cujo consumo foi destinado à formação de outros produtos tais como células, glicerol e ácido acético.

Valores semelhantes de  $\gamma_{P/S}$  (0,36 a 0,40  $\text{g}_S.\text{g}_P^{-1}$ ) e de  $\epsilon_f$  (70,80 a 78,40%), em relação aos encontrados no presente trabalho após 288 h de fermentação, foram reportados por Martínez, Vivas e Quicazán (2016), em hidroméis, com valores de pH entre 3,60 e 4,00, obtidos a partir de mostos de mel, com TSS inicial igual a 24°Brix e suplementados com 5  $\text{g}.\text{kg}^{-1}$  de uma fonte proteica, por células de *Saccharomyces cerevisiae* livres (280 h de fermentação) ou imobilizadas (400 h de fermentação), sendo que os maiores valores destes parâmetros foram encontrados nas fermentações conduzidas pelas células imobilizadas.

Como a  $Q_P$  é diretamente proporcional à concentração de etanol produzido, seus valores (Figuras 30 a 32), em cada tempo individual de fermentação, foram maiores nos mostos que apresentaram maiores concentração de etanol. Sendo assim, para os mostos com pH inicial igual a 3,5 (Figura 30), durante a maior parte do tempo de fermentação, mais especificamente a partir das 144 h os mostos de mel contendo 10% m/v de graviola (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) apresentaram maiores valores de  $Q_P$ , alcançando um valor final igual a 0,406  $\text{g}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (288 h de fermentação), enquanto que os mostos sem adição de graviola apresentaram menores valores de  $Q_P$  a partir das 48 h, apresentando um valor final igual a 0,406  $\text{g}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (288 h).

Nos ensaios com pH inicial igual a 5,0 (Figura 31), a partir de 24 h de fermentação, os mostos de mel contendo 20% m/v de graviola (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) apresentaram valores de  $Q_P$ , com valores finais entre 0,415 e 0,420  $\text{g}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$

(288 h), enquanto que os mostos sem suplementação com graviola apresentaram, partir de 48 h de fermentação, valores de  $Q_P$  menores ao final desse processo  $0,389 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (288 h).

Nos ensaios com pH inicial 6,5, (Figura 32), a partir de 168 h de fermentação, os mostos com 10% m/v de graviola (50% m/m de polpa líquida e 50% m/m de porção fibrosa) apresentaram valores de  $Q_P$  menores apresentando, ao final da fermentação,  $0,389 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (288 h). Os ensaios com pH inicial 6,5, assim como nos mostos com os outros valores iniciais de pH iguais a 3,5 e 5,0, apresentaram valores de  $Q_P$  inferiores aos encontrados nos demais mostos ao longo da fermentação, apresentando um valor final igual a  $0,313 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (288 h).

Martínez Vivas e Quicazán (2016), nos mostos de mel fermentados durante 288 h, os valores de  $Q_P$  ( $0,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foram consideravelmente inferiores aos obtidos no presente trabalho, após o mesmo tempo de fermentação. Assim, nota-se que a suplementação com polpa de frutas é algo benéfico para a produção de etanol e, conseqüentemente, para obtenção de maiores valores de  $Q_P$ .

Amorim (2017), após a fermentação de mostos de mel (pH e TSS iniciais iguais a 5,0 e  $28,5 \text{ }^\circ\text{Brix}$ , respectivamente) suplementados com acerola (25%), por 144 h, obteve semelhantes valores de  $\gamma_{P/S}$  ( $0,3961 \text{ g}_S.\text{g}_P^{-1}$ ) e  $\epsilon_f$  (77,51%) e superiores de  $Q_P$  ( $0,78 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) aos reportados no presente trabalho em mostos com pH inicial 5,0 e concentrações de graviola entre 20 e 30% m/m, também após 144 h de fermentação (Figura 31). Assim, a graviola, apesar de ter proporcionado, rendimentos de conversão de açúcares em etanol semelhantes aos da acerola, proporcionou menor produção de etanol do que esta última.

### 5.3.2.3. Análise estatística dos resultados

As Tabelas 19 e 21 apresentam as matrizes com os valores das variáveis experimentais independentes (percentuais de graviola e da fibra do mesmo fruto, e o pH inicial de fermentação) sobre as respostas ( $Q_P$  e  $\epsilon_f$ ) dos ensaios 1 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$  evidenciado na Tabela 9.

As Tabelas 20, 22 e 23 apresentam os resultados das análises de variância (ANOVA), erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as variáveis de resposta experimentais ( $Q_P$  e  $\epsilon_f$ ) para verificar a significância das 3 variáveis independentes (Tabela 9), individualmente ou em conjunto (as interações entre as mesmas), após 192 e 288 h de fermentação.

Também foram realizadas ANOVA para os valores de  $Q_P$  e  $\epsilon_f$  após 216, 240 e 264 h de fermentação, porém não houveram efeitos significativos das variáveis experimentais, e das interações entre as mesmas, sobre as respostas ( $Q_P$  e  $\epsilon_f$ ).

**Tabela 19:** Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais independentes e dependentes (de resposta), para os ensaios 1 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata do ponto central, após 192 h de fermentação.

	1 Concentração de Graviola	2 Concentração de Fibra de Graviola	3 pH inicial	4 Qp (g/L.h)	5 Eficiência (%)
1	1	1	1	0,520148958	78,8184666
2	1	1	-1	0,538430208	77,7236583
3	1	-1	1	0,535925	77,9171381
4	1	-1	-1	0,532133333	78,1585551
5	-1	1	1	0,558126563	80,6105069
6	-1	1	-1	0,578202083	77,7135372
7	-1	-1	1	0,492171875	78,6920502
8	-1	-1	-1	0,553326042	77,2919684
9 (C)	0	0	0	0,600464583	76,9042674
10(C)	0	0	0	0,569460938	77,3800936
11(C)	0	0	0	0,526593099	79,0095404

Fonte: O autor.

**Tabela 20:** ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as eficiências fermentativas nos mostos de mel após 192 h de fermentação.

ANOVA; Var.:Eficiência (%); R-sqr=,98939; Adj:,96462 2**(3-0) design; MS Pure Error=,0566076 DV: Eficiência (%)					
Factor	SS	df	MS	F	p
<b>Curvatr.</b>	<b>3,27321</b>	<b>1</b>	<b>3,273215</b>	<b>57,82292</b>	<b>0,016858</b>
(1)Concentração de Graviola	0,35712	1	0,357116	6,30862	0,128630
(2)Concentração de Fibra de Graviola	0,98453	1	0,984525	17,39211	0,052970
(3)pH inicial	<b>3,31588</b>	<b>1</b>	<b>3,315883</b>	<b>58,57666</b>	<b>0,016647</b>
1 by 2	0,43879	1	0,438794	7,75151	0,108426
1 by 3	<b>1,48235</b>	<b>1</b>	<b>1,482350</b>	<b>26,18642</b>	<b>0,036131</b>
2 by 3	1,00332	1	1,003316	17,72407	0,052054
Lack of Fit	0,00323	1	0,003227	0,05700	0,833538
Pure Error	0,11322	2	0,056608		
Total SS	10,97164	10			

Fonte: O autor.

Após 192 h de fermentação nenhum parâmetro foi significativo sobre a resposta  $Q_p$ , levando em consideração o intervalo de confiança de 95%. Em relação a  $\varepsilon_f$ , o pH inicial de fermentação e a interação entre a concentração de graviola e o pH inicial dos mostos foram significativos sobre esta resposta com  $R^2$  igual a 0,9893 ao nível de confiança de 95%, conforme a Tabela 20.

**Tabela 21:** Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais independentes e dependentes (de resposta), para os ensaios 1 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata do ponto central, após 288 h de fermentação.

	1 Concentração de Graviola	2 Concentração de Fibra de Graviola	3 pH inicial	4 Qp (g/L.h)	5 Eficiência (%)
1	1	1	1	0,361824306	78,4074308
2	1	1	-1	0,369642361	77,7076671
3	1	-1	1	0,372242361	77,5501856
4	1	-1	-1	0,36018125	77,7581207
5	-1	1	1	0,400914583	77,061963
6	-1	1	-1	0,405581944	77,462421
7	-1	-1	1	0,366166667	77,7258365
8	-1	-1	-1	0,383111806	77,291358
9 (C)	0	0	0	0,420477778	76,4810872
10(C)	0	0	0	0,414903125	76,62625
11(C)	0	0	0	0,416613889	76,654574

Fonte: O autor.

**Tabela 22:** ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as produtividades volumétricas de etanol nos mostos de mel após 288 h de fermentação.

Factor	ANOVA; Var.:Qp (g/L.h); R-sqr=,97408; Adj.:91361 2**(3-0) design; MS Pure Error=,0000082 DV: Qp (g/L.h)				
	SS	df	MS	F	p
<b>Curvatr.</b>	<b>0,003469</b>	<b>1</b>	<b>0,003469</b>	<b>425,3382</b>	<b>0,002343</b>
(1)Concentração de Graviola	0,001055	1	0,001055	129,4032	0,007639
(2)Concentração de Fibra de Graviola	0,000396	1	0,000396	48,5149	0,019996
(3)pH inicial	0,000038	1	0,000038	4,6241	0,164492
1 by 2	0,000423	1	0,000423	51,8718	0,018738
1 by 3	0,000084	1	0,000084	10,2463	0,085295
2 by 3	0,000007	1	0,000007	0,8856	0,446008
Lack of Fit	0,000129	1	0,000129	15,8492	0,057689
Pure Error	0,000016	2	0,000008		
Total SS	0,005617	10			

Fonte: O autor.

**Tabela 23:** ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as eficiências fermentativas nos mostos de mel após 288 h de fermentação.

ANOVA; Var.:Eficiência (%); R-sqr=,88509; Adj.,61695 2**(3-0) design; MS Pure Error=,008662 DV: Eficiência (%)					
Factor	SS	df	MS	F	p
<b>Curvatr.</b>	<b>2,329633</b>	<b>1</b>	<b>2,329633</b>	<b>268,9479</b>	<b>0,003698</b>
(1)Concentração de Graviola	0,442659	1	0,442659	51,1034	0,019012
(2)Concentração de Fibra de Graviola	0,012323	1	0,012323	1,4226	0,355285
(3)pH inicial	0,034565	1	0,034565	3,9904	0,183832
1 by 2	0,211121	1	0,211121	24,3731	0,038665
1 by 3	0,026199	1	0,026199	3,0245	0,224144
2 by 3	0,000662	1	0,000662	0,0764	0,808179
Lack of Fit	0,379597	1	0,379597	43,8232	0,022066
Pure Error	0,017324	2	0,008662		
Total SS	3,454081	10			

**Fonte:** O autor.

Os dados expostos nas Tabelas 22 e 23 demonstraram que no tempo de 288 h de fermentação dos mostos de mel suplementados com graviola considerando o nível de confiança de 95%, o efeito das concentrações de graviola e da fibra deste fruto, bem como o efeito da interação dessas duas variáveis, foram significativas sobre a resposta  $Q_P$  com  $R^2$  igual a 0,9741.

Para este mesmo tempo, em relação às eficiências fermentativas, a concentração de graviola e a interação desta com a concentração da fibra da mesma tiveram efeito significativo sobre a variável de resposta ( $\varepsilon_f$ ) com  $R^2$  igual a 0,8841. Para este tempo de fermentação (288 h) observou-se uma falta de ajuste significativa, no intervalo de confiança de 95% (neste caso, em relação a  $\varepsilon_f$ ).

Analisando os valores de  $R^2$  de todas as ANOVA explicitadas anteriormente, a que apresentou maior valor deste coeficiente foi a referente às eficiências fermentativas nos mostos de mel, suplementados com graviola, após 192 h de fermentação destes, com  $R^2$  igual a 0,98939. Neste caso, a interação entre a concentração de graviola e o pH inicial dos mostos apresentaram efeito significativo sobre a variável de resposta correspondente ( $\varepsilon_f$ ).

A seguir foi realizada a avaliação estatística dos ensaios do delineamento composto central, de ordem  $2^2$ , com a adição de mais 4 ensaios fermentativos, avaliando os efeitos significativos sobre as mesmas variáveis experimentais de respostas ( $Q_P$  e  $\varepsilon_f$ ).

A Tabela 24, apresenta dados referentes à matriz com os valores das variáveis experimentais independentes (percentuais de graviola e pH inicial de fermentação) e das dependentes ou respostas ( $Q_P$  e  $\varepsilon_f$ ) nos ensaios 1 a 15 do delineamento composto central  $2^2$ , enquanto que a Tabela 25 apresenta os dados resultantes das análises ANOVA, erro puro no

nível de confiança de 95%, para a variável de resposta experimental  $Q_P$  dos ensaios mencionados, após 288 h de fermentação. Também foram realizadas ANOVA para os valores de  $Q_P$  e  $E_f$  após 192, 216, 240 e 264 horas, porém não foi verificado efeitos significativos das variáveis experimentais, e nem das interações entre as mesmas, sobre as respostas ( $Q_P$  e  $\varepsilon_f$ ).

**Tabela 24:** Matriz dos valores codificados das variáveis experimentais de entrada e de saída para os ensaios 1 a 15 do delineamento composto central  $2^2$ , com triplicata do ponto central, após 288 h de fermentação.

Standard Run	Percentual de Graviola	pH inicial	Qp (g/L.h)	Eficiência (%)
1	1	1	0,3618243	78,4074308
2	1	-1	0,3696424	77,7076671
3	1	1	0,3722424	77,5501856
4	1	-1	0,3601813	77,7581207
5	-1	1	0,4009146	77,061963
6	-1	-1	0,4055819	77,462421
7	-1	1	0,3661667	77,7258365
8	-1	-1	0,3831118	77,291358
9 (C)	0	0	0,4204778	76,4810872
10 (C)	0	0	0,4149031	76,62625
11 (C)	0	0	0,4166139	76,654574
12	0	1	0,375287	77,686354
13	1	0	0,3659726	77,8558511
14	0	-1	0,3796293	77,5548917
15	-1	0	0,3889438	77,3853946

Fonte: O autor.

**Tabela 25:** ANOVA, por erro puro e intervalo de confiança de 95%, para as produtividades volumétricas de etanol nos mostos de mel após 288 h de fermentação.

ANOVA; Var.: Qp (g/L.h) 288 h; R-sqr=,66945; Adj.: 4858					
2 factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=,0001619					
DV: Qp (g/L.h) 288 h					
Factor	SS	df	MS	F	p
<b>(1)Percentual de Graviola (L)</b>	<b>0,001319</b>	<b>1</b>	<b>0,001319</b>	<b>8,147345</b>	<b>0,029015</b>
Percentual de Graviola (Q)	0,000818	1	0,000818	5,049883	0,065694
<b>(2)pH inicial(L)</b>	<b>0,000047</b>	<b>1</b>	<b>0,000047</b>	<b>0,291140</b>	<b>0,608917</b>
pH inicial(Q)	0,000818	1	0,000818	5,049883	0,065694
1L by 2L	0,000084	1	0,000084	0,516092	0,499520
Lack of Fit	0,001090	3	0,000363	2,244392	0,183600
Pure Error	0,000971	6	0,000162		
Total SS	0,006237	14			

Fonte: O autor.

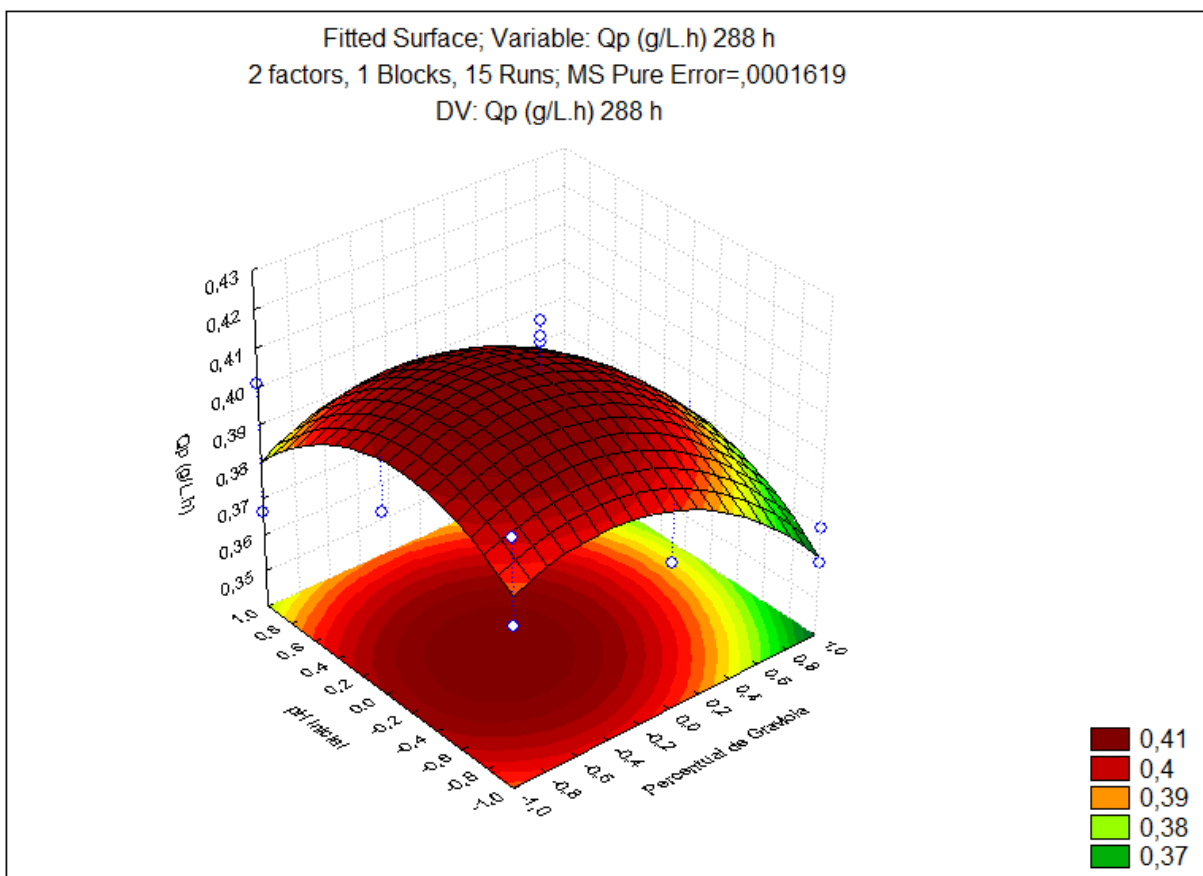
Diante dos dados expostos na Tabela 25, verificou-se que o percentual de graviola foi a única variável que teve efeito significativo sobre a resposta  $Q_P$ , ao nível de confiança igual a 95% com  $R^2$  igual a 0,6694. Nenhuma variável experimental independente, ou a interação



entre as mesmas, apresentou efeito significativo sobre a eficiências fermentativas nos ensaios experimentais realizados.

Então, a partir desta ANOVA foi elaborado o gráfico de superfície de resposta (Figura 33), e sua respectiva equação, para verificar os valores do percentual de graviola e do pH inicial de fermentação que proporcionaram o valor ótimo da eficiência fermentativa após 288 h de fermentação.

**Figura 33:** Superfície de resposta das produtividades volumétricas de etanol ( $Q_p$ ) em função do percentual de graviola e do pH inicial dos mostos de mel, suplementados com graviola, correspondentes aos 15 ensaios do delineamento composto central  $2^2$ .



Fonte: O autor.

A função que correlaciona as variáveis apresentadas na superfície de resposta (Figura 43), sendo  $x$  o percentual de graviola,  $y$  o pH inicial e  $z$  a produtividade volumétrica de etanol é:

$$z = 0,40821766865079 - 0,011485590277778x - 0,017088616071429x^2 - 0,0021711805555555y - 0,017088616071429y^2 + 0,0032319444444444xy$$

O valor ótimo de z corresponde aos valores de x e y que satisfazem as derivadas parciais da função acima ( $\delta z/\delta x$  e  $\delta z/\delta y$ ) iguais a 0.

$$\delta z/\delta x = -0,011485590277778 - 0,034177232142458x + 0,0032319444444444y = 0$$

$$\delta z/\delta y = -0,0021711805555555 - 0,034177232142458y + 0,0032319444444444x = 0$$

Correlacionando as duas equações acima e resolvendo os sistemas de equações derivados dessa correlação, encontram-se os valores de x e y iguais a -0,345154 e -0,096166, respectivamente, conforme os valores críticos calculados pelo próprio software utilizado, conforme a Tabela 26, a seguir.

**Tabela 26:** Valores críticos codificados do percentual de graviola e do pH inicial em relação às produtividades volumétricas de etanol após 288 h fermentação dos mostos de mel suplementados com graviola.

Factor	Critical values; Variable: Qp (g/L.h) 288 h (DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL - KAYQUE FROTA) Solution: maximum Predicted value at solution: .4103042		
	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
Percentual de Graviola	-1,00000	-0,345154	1,000000
pH inicial	-1,00000	-0,096166	1,000000

**Fonte:** O autor.

Estes valores de x e y correspondem aos valores ótimos, codificados, do percentual de graviola e do pH inicial de fermentação em relação à  $Q_P$  após 288 h de fermentação dos mostos. Os valores reais dessas variáveis, tomando como referência os códigos expostos na Tabela 9, são: concentração de graviola aproximadamente igual a 16,55% m/v e; pH inicial igual a, aproximadamente, 4,86. Os valores das variáveis experimentais de entrada são próximos aos dos ensaios 9 a 11 correspondentes ao ponto central do planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 9).

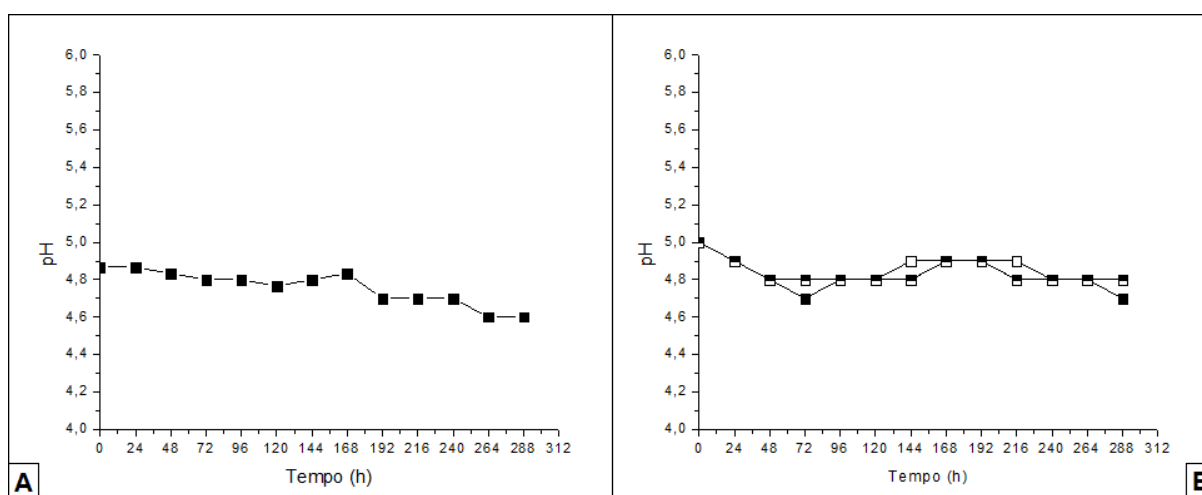
### 5.3.3. Fermentação em escala laboratorial ampliada

#### 5.3.3.1. Perfis das concentrações celulares, concentrações de açúcares e dos produtos primários e secundários da fermentação

A seguir, na Figura 34, são apresentados os potenciais hidrogeniônicos (pH) durante a fermentação do mosto de mel em escala laboratorial ampliada, que foi suplementado com 16,55% de graviola (desses, 75% de polpa líquida e 25% de fibra) e, e pH inicial ajustado em aproximadamente 4,9 e, ao mesmo tempo apresenta os valores desses parâmetro nos 9, 10 e

11 (Tabela 9) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel.

**Figura 34:** Perfis dos valores de pH (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).

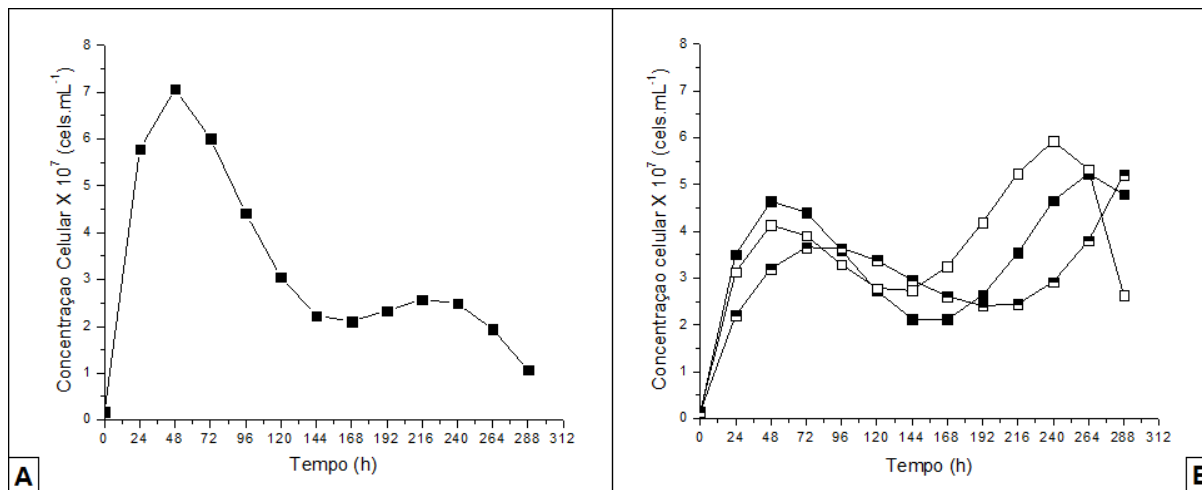


Fonte: O autor.

O pH no mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada (Figura 34-A) variou de 4,9 a 4,6 durante as 288 h de fermentação. Não foram verificadas variações bruscas de pH durante a fermentação permanecendo estável durante toda a fermentação. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos nos ensaios 7 a 9 do planejamento fatorial  $2^3$  contendo 20% m/v de graviola, sob a forma de mistura de polpa líquida (75% m/m) e porção fibrosa (25% m/m), conforme a Figura 34-B, que iniciaram as fermentações em valores de pH iguais a 5,0 e, ao final das mesmas (288 h) os valores desse parâmetro foram iguais a 4,7. Ao longo do tempo de fermentação o pH se manteve entre 4,7 e 5,1, sem apresentar oscilações abruptas.

A Figura 35, a seguir, apresenta o perfil das concentrações celulares no mosto de mel suplementado com graviola, durante as 288 h de fermentação em escala laboratorial ampliada.

**Figura 35:** Perfis dos valores de concentração celular (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.

A concentração de células no mosto de mel, suplementado com graviola, fermentado em escala laboratorial ampliada (Figura 35-A), apresentou um aumento acentuado das 0 a 48 h, mais especificamente de  $1,70 \times 10^6$  a  $7,07 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, sendo este último o valor máximo de concentração celular apresentado no referido mosto, valor esse superior aos encontrados nos ensaios 9, 10 e 11 ( $5,23 \times 10^7$ ,  $5,93 \times 10^7$  e  $5,21 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, após 264, 240 e 288 h de fermentação, respectivamente, conforme Figura 35-B).

Os valores de concentração celular, no mosto de mel referente à fermentação em escala ampliada apresentaram, nas primeiras 24 h de fermentação, um aumento de 3.289,0%, valor esse superior aos apresentados nos ensaios 9, 10 e 11 (2.692,5%, 2.023,3% e 1.387,0%).

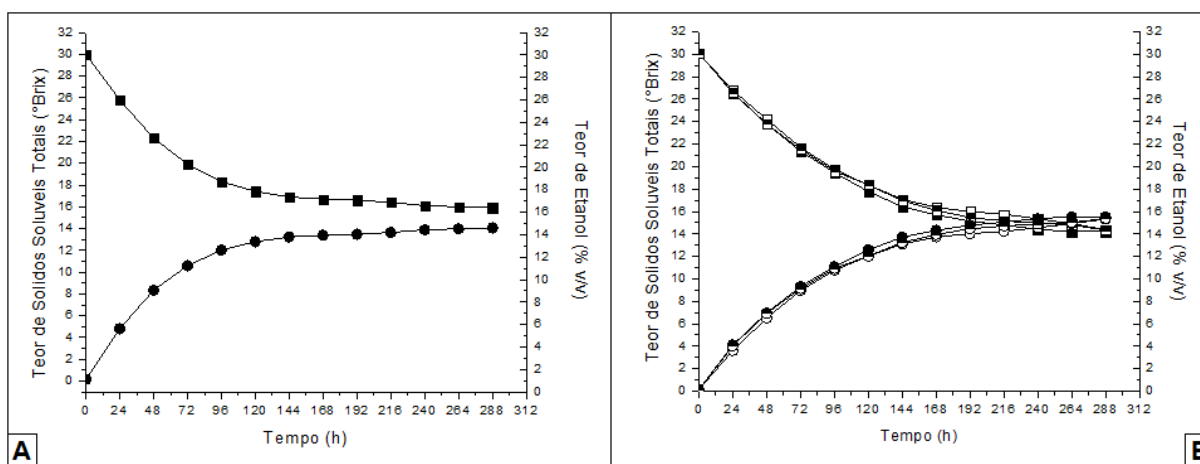
Os resultados acima indicam que a redução da concentração de graviola de 20% para 16,55% m/v (mantendo as mesmas proporções de polpa líquida, 75% m/m, e de porção fibrosa, 25% m/m) nos mostos de mel proporcionou um maior crescimento celular nas primeiras 48 h de fermentação.

Entre as 48 e 144 h de fermentação, conforme a Figura 35-A, os valores da concentração celular apresentaram um decréscimo contínuo de  $3,25 \times 10^7$  até  $2,22 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup> e, após isso, de 144 a 240 h, os valores deste parâmetro se mostraram relativamente estáveis em comparação ao restante do período de fermentação, variando de  $2,22 \times 10^7$  até  $2,49 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup> no referido período. De 240 a 288 h de fermentação, as concentrações celulares voltaram a apresentar decréscimo em seus valores, variando de  $2,49 \times 10^7$  a  $1,06 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>.

O valor final de concentração celular no mosto de mel, suplementado com graviola, fermentado em escala laboratorial ampliada, ao final do processo fermentativo (288 h) foi inferior aos obtidos no tempo final da fermentação dos mostos referentes aos ensaios 9 a 11, sendo que, nos mesmos, os valores desse parâmetro variaram de  $2,63 \times 10^7$ , no ensaio 10, até  $5,21 \times 10^7$  cels.mL<sup>-1</sup>, no ensaio 11.

As Figuras 36 e 37, a seguir, apresentam o consumo de substrato e a produção de etanol no mosto de mel, suplementado com graviola, durante a fermentação do mesmo em escala laboratorial ampliada e, nos ensaios 9 a 11 do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 9) para avaliar o efeito da concentração de graviola, do percentual de porção fibrosa deste fruto, e do pH sobre os processos fermentativos destes mostos, através dos perfis de teor de sólidos solúveis totais (Figura 36), de açúcares redutores totais (Figura 37) e de etanol (Figuras 36 e 37).

**Figura 36:** Perfis do teor de sólidos solúveis totais (■) e de etanol (●), durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A); perfis de teor de sólidos solúveis totais nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣), e perfis do teor de etanol nos ensaios 9 (●), 10 (○) e 11 (◐) do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.

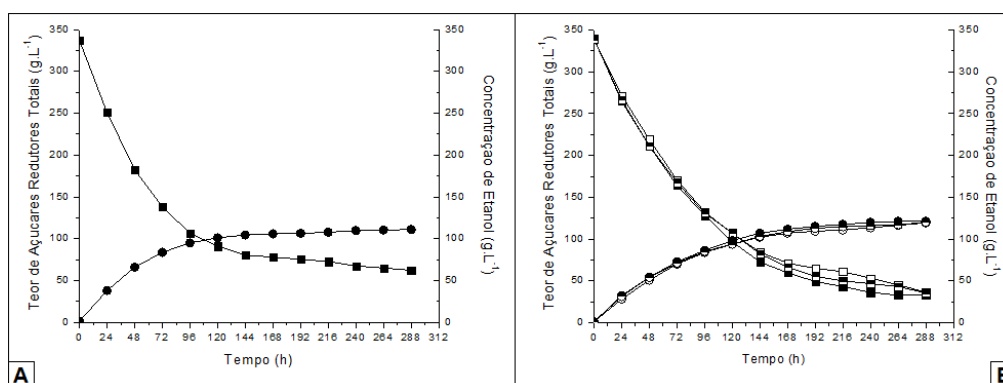
Nas primeiras 144 h de fermentação, o TSS no mosto de mel, fermentado em escala laboratorial ampliada, suplementado com graviola (16,55% m/v, destes 75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa), reduziu consideravelmente, variando de 30,0 até 16,9 °Brix, enquanto que, nesse mesmo intervalo de tempo, o teor volumétrico de etanol aumentou consideravelmente, de 0,1 a 14,1% v/v, conforme a Figura 36-A.

Nas primeiras 24 h de fermentação, o valor de TSS, no mosto mencionado acima, reduziu aproximadamente 14,0%, enquanto que o teor volumétrico de etanol aumentou aproximadamente 4.700% neste intervalo de tempo. Estes percentuais se mostraram superiores aos ocorridos nos mostos de mel referentes aos ensaios 9, 10 e 11, do planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 9), conforme a Figura 36-B, sendo que, nos referidos mostos, a redução dos valores de TSS, nas primeiras 24 h de fermentação, variou de 10,6 a 11,6% v/v, enquanto que o aumento dos valores volumétricos de etanol variou entre 3.500 e 4.000%.

A partir das 168 h de fermentação, nos mostos de mel referentes à fermentação em escala laboratorial ampliada, conforme a Figura 36-A, os valores de TSS totais começaram a se mostrar relativamente estáveis, variando de 16,7 °Brix, após 168 h, até 15,9 °Brix, no final da fermentação (288 h). Nesse mesmo período de tempo, os teores volumétricos de etanol, assim como os de TSS totais, se mostraram relativamente estáveis, aumentando de 13,3 a 14,1% v/v.

O valor final de TSS do mosto de mel, suplementado com graviola, fermentado em escala laboratorial ampliada se apresentaram superiores aos apresentados no final da fermentação dos ensaios 9 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$ , sendo que, conforme a Figura 36-B, estes apresentaram valores entre 14,2 e 14,4 °Brix, enquanto que, o valor final do teor volumétrico de etanol do mosto fermentado em escala laboratorial ampliada se apresentou inferior aos que foram encontrados nos mostos referentes os ensaios 9 a 11 (que, após de 288 do início da fermentação, foram verificados teores de etanol entre 15,3 a 15,5% v/v).

**Figura 37:** Perfis do teor de açúcares redutores totais (■) e da concentração de etanol (●), durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A); perfis de teor de açúcares redutores totais nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣), e perfis da concentração de etanol nos ensaios 9 (●), 10 (○) e 11 (⊙) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.

Os teores de açúcares redutores totais do mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada (Figura 37-A) apresentaram uma diminuição acentuada nas primeiras 144 h de fermentação (assim como ocorreu com os valores de TSS totais neste mesmo mosto) e, nesse mesmo intervalo de tempo, as concentrações de etanol (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) apresentaram um aumento intenso, assim como ocorrido com as concentrações volumétricas desta substância no referido mosto de mel suplementado com graviola.

Sendo assim, nas primeiras 144 h de fermentação, os teores de açúcares redutores totais variaram de 337,2 a 80,4  $\text{g.L}^{-1}$ , correspondendo a uma redução de 76,2% do teor destes componentes no mosto de mel, enquanto que as concentrações de etanol, neste mesmo intervalo de tempo, aumentaram de 1,1 a 110,9  $\text{g.L}^{-1}$ , correspondendo a um aumento de 9.981,8% (ou 100,8 vezes) na concentração desta substância no referido mosto de mel.

Nas primeiras 24 h de fermentação, conforme a Figura 37-A, o percentual (25,6%) de diminuição do teor de açúcares redutores totais do mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada foi superior aos referidos percentuais (19,8 a 22,1%) nos mostos correspondentes aos ensaios 9 a 11 (Figura 37-B) do planejamento fatorial, enquanto que, nesse mesmo intervalo de tempo, o percentual (3.345,5%) de aumento da concentração de etanol no mosto fermentado em escala laboratorial ampliada se apresentou superior aos percentuais (2.454,5 a 2.827,3%) de aumento desta substância encontrados nos mostos referentes aos ensaios 9 a 11.

A partir de 168 h do início da fermentação, a diminuição dos teores de açúcares redutores totais, e o aumento nas concentrações de etanol no mosto de mel (suplementado com graviola e fermentado em escala laboratorial ampliada) se tornaram menos intensos do que os ocorridos nos tempos anteriores de fermentação. Das 168 h até as 288 h de fermentação, os teores de açúcares redutores totais diminuíram de 77,9 até 62,2  $\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que as concentrações de etanol, neste mesmo intervalo de tempo, aumentaram de até 105,6 até 110,9  $\text{g.L}^{-1}$ .

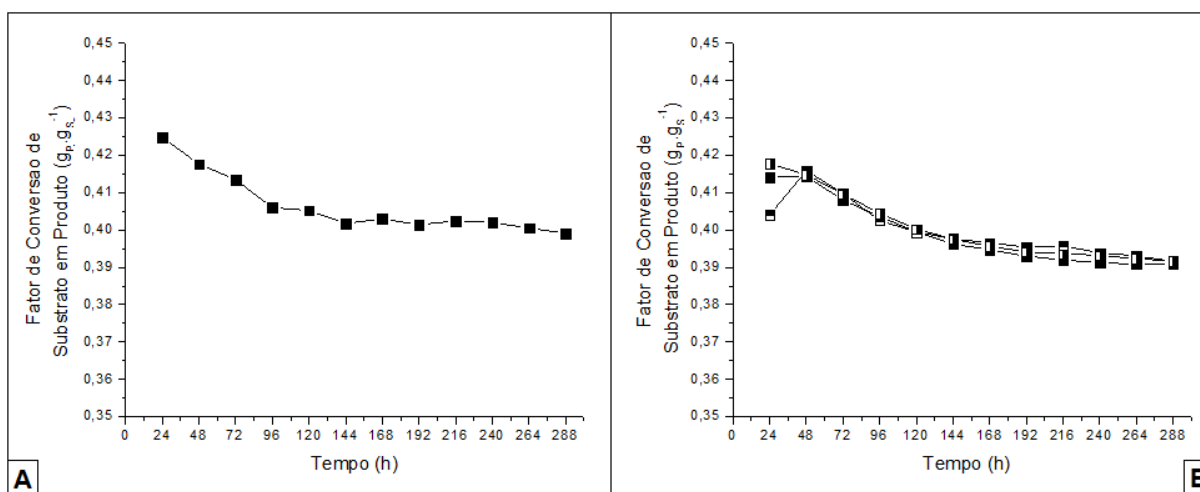
Os valores finais de açúcares redutores totais, no referido mosto, foram superiores aos valores finais (32,8 a 36,2  $\text{g.L}^{-1}$ ) encontrados destes componentes nos ensaios 9 a 11, do planejamento fatorial  $2^3$  cuja matriz está descrita na Tabela 9, enquanto que a concentração final de etanol no mosto referente à fermentação em escala laboratorial ampliada se mostrou inferior aos valores (119,4 a 121,1  $\text{g.L}^{-1}$ ) deste parâmetro encontrados nos mostos referentes aos ensaios 9 a 11.

Ao longo das 288 h de fermentação em escala laboratorial ampliada do mosto de mel, suplementado com graviola, os percentuais de consumo de açúcares redutores e de produção de etanol foram respectivamente iguais a 81,6% e 9.981,8%. Sendo assim, os percentuais de consumo de açúcares redutores e de produção de etanol, no referido mosto, foram inferiores aos registrados para os ensaios 9 a 11 (mais especificamente, de 89,3 a 90,3%, no caso dos percentuais de consumo de açúcares redutores, e de 10.763,6 a 10.901,1%).

Isto indica que a redução do percentual de graviola de 20% m/v (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa) para 16,55% do mesmo fruto (mantendo os mesmos percentuais de polpa líquida e porção fibrosa) gerou uma redução do consumo de substrato, sob a forma de açúcares redutores, e da produção do etanol.

As Figuras 38 e 39, a seguir, apresentam os valores do fator de conversão de substrato em produto ( $\gamma_{P/S}$ ) e eficiência fermentativa ( $\epsilon_f$ ) no mosto de mel, suplementado com graviola, durante a fermentação do mesmo em escala laboratorial ampliada e, nos ensaios 9 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 9) para verificação do efeito da concentração de graviola, do percentual de porção fibrosa deste fruto, e do pH sobre os processos fermentativos destes mostos.

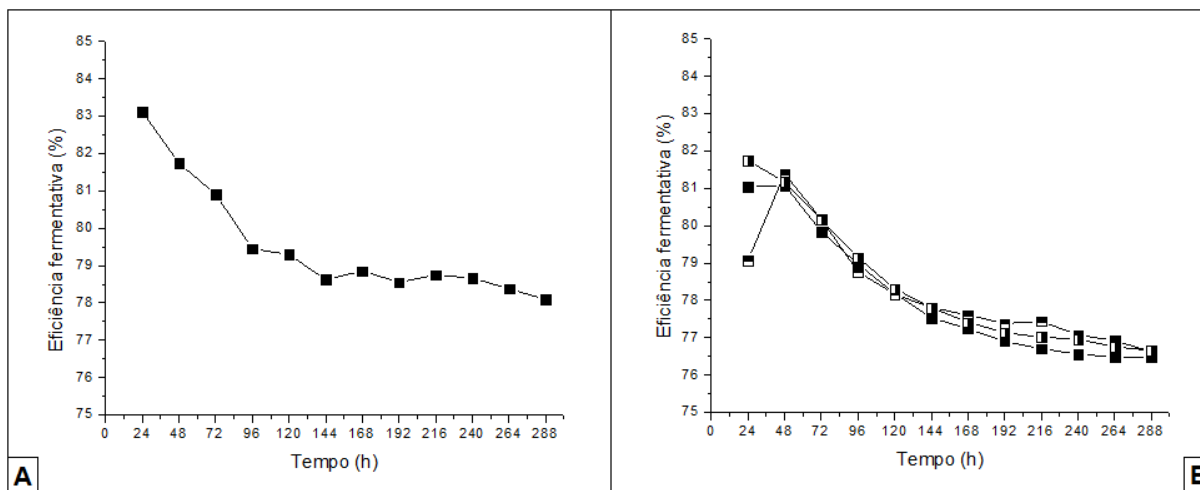
**Figura 38:** Perfis dos valores do fator de conversão de substrato em produto (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.



**Figura 39:** Perfis dos valores da eficiência fermentativa (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.

Os valores de  $\gamma_{P/S}$  (Figura 38-A) e de  $\epsilon_f$  (Figura 39-A) no mosto de mel, suplementado com graviola, cuja fermentação foi realizada em escala laboratorial ampliada, apesar de diminuir com o avanço do tempo, variaram pouco durante as 288 h de fermentação. Os valores de  $\gamma_{P/S}$  variaram 0,425 a 0,399  $\text{g}_P.\text{g}_S^{-1}$ , enquanto os de  $E_f$  variaram 83,1 a 78,1%, das 24 às 288 h de fermentação. Isto indica que, com o avanço do tempo de fermentação, o aproveitamento dos açúcares consumidos para a produção de etanol diminuiu, provavelmente havendo “desvio” da utilização do substrato consumido pelas leveduras para a formação de produtos secundários da fermentação alcoólica.

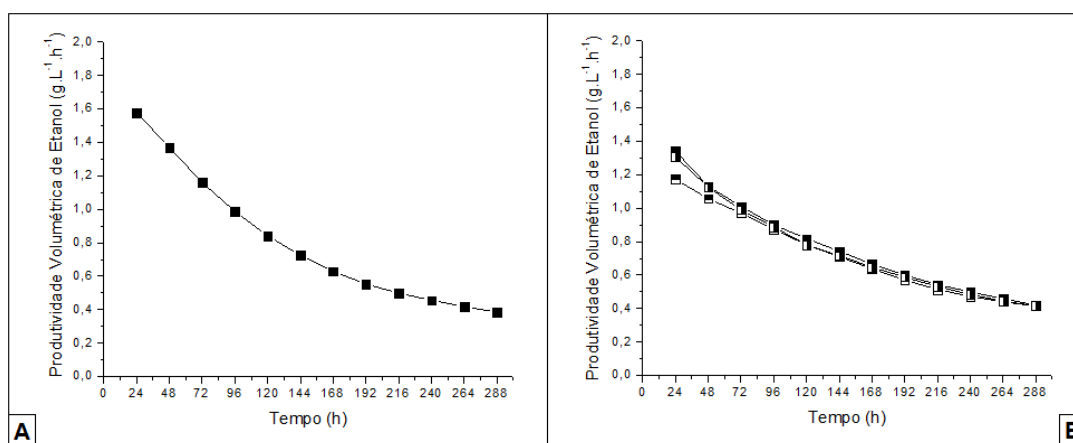
Nos ensaios 9 a 11, do planejamento fatorial  $2^3$  para a avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra na polpa adicionada do referido fruto e do pH inicial de fermentação, conforme a Figuras 38-B e 39-B, os valores de  $\gamma_{P/S}$  e  $\epsilon_f$  no das fermentações variaram de 0,404 a 0,414  $\text{g}_P.\text{g}_S^{-1}$  ( $\gamma_{P/S}$ ) e de 79,1 a 81,7% ( $\epsilon_f$ ), enquanto que, no final deste processo (288 h), os valores dos parâmetros mencionados variaram de 0,390 a 0,391  $\text{g}_P.\text{g}_S^{-1}$  ( $\gamma_{P/S}$ ) e de 79,1 a 81,7% ( $\epsilon_f$ ), indicando que os valores desses parâmetros, assim como no mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada, diminuiriam ao longo do processo fermentativo.

Comparando os valores de  $\gamma_{P/S}$  e  $\epsilon_f$  no mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada com os dos ensaios 9 a 11, no primeiro caso estes valores foram maiores durante praticamente todo o período de 288 h de fermentação, indicando que, a redução do percentual

de graviola de 20% m/v para 16,55% m/v na suplementação dos mostos de mel favoreceu o aproveitamento dos açúcares consumidos para a produção de etanol.

Os valores da produtividade volumétrica de etanol no mosto de mel, suplementado com graviola, durante a fermentação do mesmo em escala laboratorial ampliada e, nos ensaios 9 a 11 do planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 9) estão apresentados na Figura 40, a seguir.

**Figura 40:** Perfis dos valores da produtividade volumétrica de etanol (■) durante a fermentação do mosto de mel, suplementado com graviola, em escala laboratorial ampliada (A) e nos ensaios 9 (■), 10 (□) e 11 (▣) do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação do efeito da concentração de graviola, do percentual de fibra deste fruto, e do pH sobre a fermentação alcoólica dos mostos de mel para a produção de hidromel (B).



Fonte: O autor.

Os valores de  $Q_P$  no mosto de mel, suplementado com graviola, em fermentação foi realizada em escala laboratorial ampliada (Figura 40-A), variaram de 1,578 a 0,85 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, após 24 a 288 h em relação ao início das fermentações e, das 24 às 120 h, os valores do referido parâmetro nos ensaios 9 a 11 do planejamento fatorial (Figura 40-B) se apresentaram menores do que os encontrados no mosto fermentado em escala laboratorial ampliada.

A partir das 144 h de fermentação, os valores de  $Q_P$  do primeiro mosto mencionado começam a se apresentar menores do que os registrados nos mostos referentes os ensaios 9 a 11, sendo que, ao final de 288 h, os valores do referido parâmetro nos mostos dos ensaios 9 a 11, conforme a Figura 40-B, variaram de 0,415 a 0,420 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

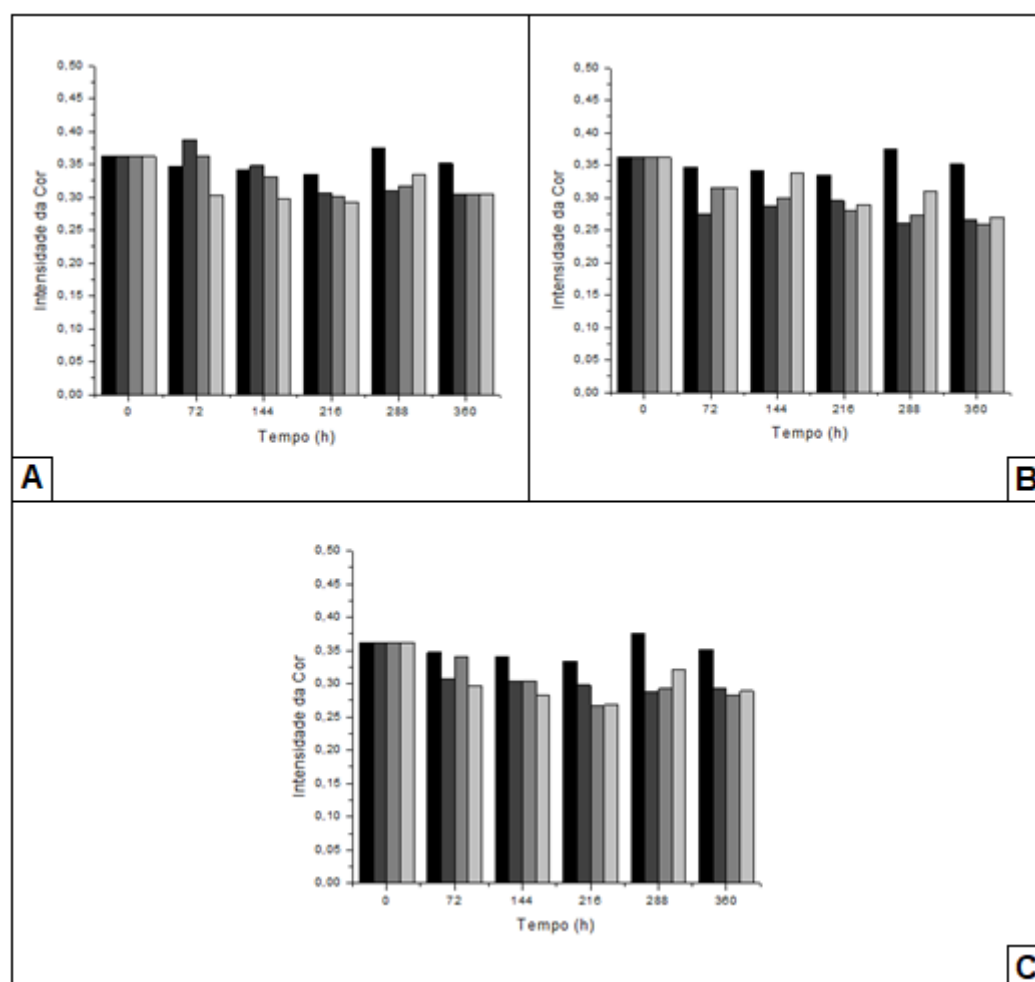
O comportamento dos valores de  $Q_P$  nos mostos mencionados era algo esperado visto que, conforme Figura 37-A, nas primeiras 120 h de fermentação, os teores de etanol no mosto de mel fermentado em escala laboratorial ampliada foram maiores do que os apresentados nos mostos referentes aos ensaios 9 a 11 e, a partir das 144 h de fermentação, esta realidade se

modificou, como os valores de  $Q_P$  são diretamente proporcionais à concentração de etanol e inversamente proporcionais ao tempo de fermentação, as variações nas concentrações desta substância nos mostos ocasionaram as mudanças encontradas nos valores de  $Q_P$ .

### 5.3.3.2. Clarificação do hidromel trasfegado

A partir dos dados apresentados nas Figuras 41 a 44, e nas Tabelas 27 a 30, podem ser observados os efeitos que exercidos pela bentonite hidratada, pelo carvão ativado e pela carboximetilcelulose (CMC), nas concentrações de 0,5 a 2,5 g.L<sup>-1</sup>, sobre os valores da intensidade da cor (I) e da tonalidade (T), e sobre os percentuais de cor amarela (%Amarelo) e de transmitância a 660 nm (%Trans660) dos hidroméis oriundos da fermentação em escala laboratorial ampliada.

**Figura 41:** Perfis da intensidade da cor do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L<sup>-1</sup> (▣), 1,5 g.L<sup>-1</sup> (▤) e 2,5 g.L<sup>-1</sup> (▥) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C).



Fonte: O autor.

**Tabela 27:** Valores e variações da intensidade da cor (I), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

Clarificante	Concentração de clarificante (g.L <sup>-1</sup> )	I ± D. P. <sup>a</sup> (0 h)	I ± D. P. <sup>a</sup> (288 h)	Intensidade mínima da cor (I <sub>mín</sub> )		Redução de I (%ΔI)	
				I <sub>mín</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	Tempo (h)	%ΔI (0 a 360 h)	
						%ΔI <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	%ΔI <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>
Nenhum	0	0,362 ± 0,000	0,351 ± 0,002	0,334 ± 0,002	216	3,0 ± 0,5	7,7 ± 0,5
Bentonite	0,5	0,362 ± 0,000	0,305 ± 0,002	0,305 ± 0,002	360	15,7 ± 0,5	15,7 ± 0,5
	1,5	0,362 ± 0,000	0,305 ± 0,002	0,300 ± 0,002	216	15,7 ± 0,5	17,1 ± 0,5
	2,5	0,362 ± 0,000	0,304 ± 0,002	0,291 ± 0,001	216	16,0 ± 0,5	19,6 ± 0,2
CMC	0,5	0,362 ± 0,000	0,266 ± 0,001	0,260 ± 0,001	288	26,5 ± 0,2	28,2 ± 0,2
	1,5	0,362 ± 0,000	0,259 ± 0,001	0,259 ± 0,001	360	28,5 ± 0,2	28,5 ± 0,2
	2,5	0,362 ± 0,000	0,270 ± 0,001	0,270 ± 0,001	360	25,4 ± 0,2	25,4 ± 0,2
Carvão ativado	0,5	0,362 ± 0,000	0,293 ± 0,001	0,287 ± 0,001	288	19,1 ± 0,2	20,7 ± 0,2
	1,5	0,362 ± 0,000	0,282 ± 0,001	0,266 ± 0,001	216	22,1 ± 0,2	26,5 ± 0,2
	2,5	0,362 ± 0,000	0,289 ± 0,001	0,268 ± 0,001	216	20,2 ± 0,2	26,0 ± 0,2

Fonte: O autor.

A simples adição de CMC ou carvão ativado aos hidroméis, independente da concentração, ocasionou a redução dos valores de I nos mesmos, mas aparentemente não houve uma correlação diretamente proporcional entre a concentração dos agentes clarificantes mencionados com a redução do referido parâmetro, conforme a Figura 41. O mesmo não ocorreu com os hidroméis contendo bentonite hidratada, visto que, nos tempos de 72 e 144 h após o início do procedimento de clarificação destas bebidas, hidroméis purificados com

bentonite apresentaram valores de I inferiores aos encontrados no ensaio controle (sem adição de clarificantes).

Os menores valores de I foram encontrados nos hidroméis sem agentes clarificantes e na maioria onde foi usada bentonite e carvão ativado (mais especificamente nas concentrações de 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>) valores mínimos ( $I_{\min}$ ) após 216 h em relação ao início do processo de clarificação, enquanto que a maioria dos mostos com adição de CMC (também nas concentrações de 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram seus valores de  $I_{\min}$  após 360 h de clarificação (ou seja, no final deste processo).

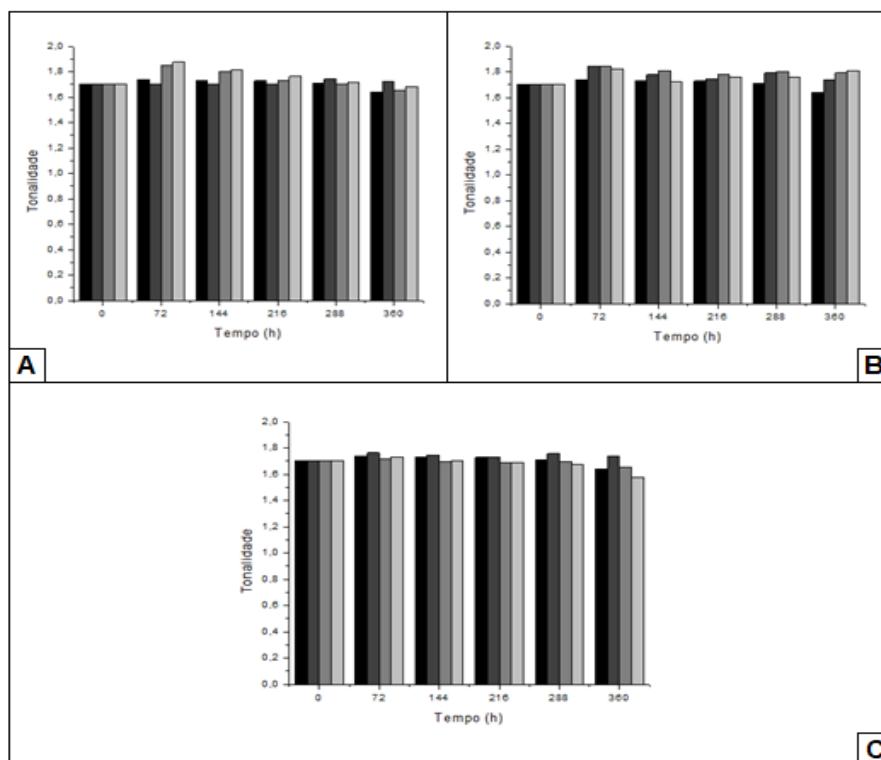
No tocante aos percentuais de redução de I (% $\Delta I$ ) nos hidroméis durante o período em que os mesmos foram submetidos à clarificação, a CMC proporcionou maiores valores máximos (% $\Delta I_{\max}$ ) destes percentuais, mais especificamente de (25,4 ± 0,2)% a (28,5 ± 0,2)%, nos hidroméis tratados com 2,5 e 1,5 g.L<sup>-1</sup> do clarificante, após 360 h de clarificação. Isto indica que a CMC, na concentração de 1,5 g.L<sup>-1</sup>, foi o clarificante mais eficaz ao proporcionar redução dos valores de I nos hidroméis produzidos, em escala laboratorial ampliada.

Os valores de  $\Delta I_{\max}$  nos hidroméis com bentonite hidratada foram os menores verificados dentre os hidroméis em que foram adicionados agentes clarificantes, sendo que estes valores variaram entre (15,7 ± 0,5)% a (19,6 ± 0,2)%, para os hidroméis com 0,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup> do referido clarificante, após 360 e 216 h de clarificação, respectivamente.

Com relação aos percentuais de redução de I (% $\Delta I$ ) nos hidroméis durante as 360 h de clarificação, assim como ocorreu com os valores de  $\Delta I_{\max}$ , a CMC proporcionou os maiores valores destes percentuais, variando de (25,4 ± 0,2)% a (28,5 ± 0,2)%, para os hidroméis tratados com 2,5 e 1,5 g.L<sup>-1</sup> deste agente clarificante, e a bentonite hidratada ocasionou os menores valores deste percentual, mais especificamente entre (15,7 ± 0,5)%, para os hidroméis com 0,5 e 1,5 g.L<sup>-1</sup> deste agente clarificante, e (16,0 ± 0,5)%, para os hidroméis com 2,5 g.L<sup>-1</sup> deste composto.

Os valores da tonalidade (T), além das variações deste parâmetro durante a clarificação de hidroméis estão apresentados na Figura 42 e na Tabela 28, a seguir.

**Figura 42:** Perfis da tonalidade do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L<sup>-1</sup> (▨), 1,5 g.L<sup>-1</sup> (▩) e 2,5 g.L<sup>-1</sup> (▧) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C).



Fonte: O autor.

**Tabela 28:** Valores e variações da tonalidade (T), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

Clarificante	Concentração de clarificante (g.L <sup>-1</sup> )	T ± D. P. <sup>a</sup> (0 h)	T ± D. P. <sup>a</sup> (288 h)	Percentual de variação de T (%ΔT) ± D. P. <sup>a</sup> , de 0 a 360 h	Tonalidades mínima (T <sub>mín</sub> ) e máxima (T <sub>máx</sub> )		
					T <sub>mín</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	T <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	Tempo(s) (h)
<b>Nenhum</b>	0	1,701 ± 0,000	1,641 ± 0,008	-3,5 ± 0,4	1,641 ± 0,008	1,738 ± 0,009	360 e 72
<b>Bentonite</b>	0,5	1,701 ± 0,000	1,720 ± 0,009	1,1 ± 0,4	1,699 ± 0,008	1,742 ± 0,009	72 e 288
	1,5	1,701 ± 0,000	1,654 ± 0,008	-2,8 ± 0,4	1,654 ± 0,008	1,851 ± 0,009	360 e 72
	2,5	1,701 ± 0,000	1,683 ± 0,008	-1,1 ± 0,4	1,683 ± 0,008	1,877 ± 0,009	360 e 72
<b>CMC</b>	0,5	1,701 ± 0,000	1,739 ± 0,008	2,2 ± 0,4	1,701 ± 0,008	1,840 ± 0,009	0 e 72

		0,000	0,009		± 0,000	± 0,009	
	1,5	1,701 ± 0,000	1,792 ± 0,009	5,3 ± 0,4	1,701 ± 0,000	1,841 ± 0,009	0 e 72
	2,5	1,701 ± 0,000	1,806 ± 0,009	6,2 ± 0,4	1,701 ± 0,000	1,818 ± 0,009	0 e 72
<b>Carvão ativado</b>	0,5	1,701 ± 0,000	1,740 ± 0,009	2,3 ± 0,4	1,701 ± 0,000	1,762 ± 0,009	0 e 72
	1,5	1,701 ± 0,000	1,651 ± 0,008	-2,9 ± 0,4	1,651 ± 0,008	1,715 ± 0,009	360 e 72
	2,5	1,701 ± 0,000	1,574 ± 0,008	-7,5 ± 0,4	1,574 ± 0,008	1,733 ± 0,009	360 e 72

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão.

**Fonte:** O autor.

Aparentemente não houve uma correlação diretamente proporcional entre as concentrações dos clarificantes adicionados ao hidroméis e os valores de T encontrados nos mesmos (Figura 42 e Tabela 28). Ao contrário do que aconteceu com os valores de I, a adição de qualquer um dos três agentes clarificantes utilizados não influenciou no aumento ou na diminuição dos valores de T durante o período em que a clarificação foi conduzida, visto que, os valores do referido parâmetro no hidromel correspondente ao ensaio controle (sem adição de clarificantes) não se apresentaram sempre maiores ou menores do que os valores de T encontrados nos hidroméis em que foram adicionados agentes clarificantes.

Após 72 h de clarificação dos hidroméis, quase todos os hidroméis apresentaram seus valores máximos de T ( $T_{\text{máx}}$ ), exceto no caso do hidromel com 0,5 g.L<sup>-1</sup> de bentonite hidratada, cujo valor de  $T_{\text{máx}}$  ocorreu após 288 h de clarificação, conforme a Tabela 28. O maior valor de  $T_{\text{máx}}$  ( $1,877 \pm 0,009$ ) ocorreu no hidromel contendo 2,5 g.L<sup>-1</sup> de bentonite hidratada e, o menor valor deste parâmetro ( $1,715 \pm 0,009$ ) ocorreu no hidromel contendo 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

No tocante aos valores mínimos de T ( $T_{\text{mín}}$ ), a maior parte dos mesmos ocorreu no final do processo de clarificação (360 h) e, no caso de todos os ensaios com CMC, os valores de  $T_{\text{mín}}$  ocorreram no início (0 h) do referido processo, sendo que, menor valor de  $T_{\text{mín}}$  ( $1,574 \pm 0,009$ ) ocorreu no hidromel contendo 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, e o maior valor deste parâmetro ( $1,701 \pm 0,009$ ) ocorreu no hidromel contendo 0,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e em todos os hidroméis contendo CMC, confirmando assim que todos os valores de T encontrados

nos hidroméis com CMC, ao longo das 360 h de clarificação, foram maiores do que os encontrados no início do referido processo.

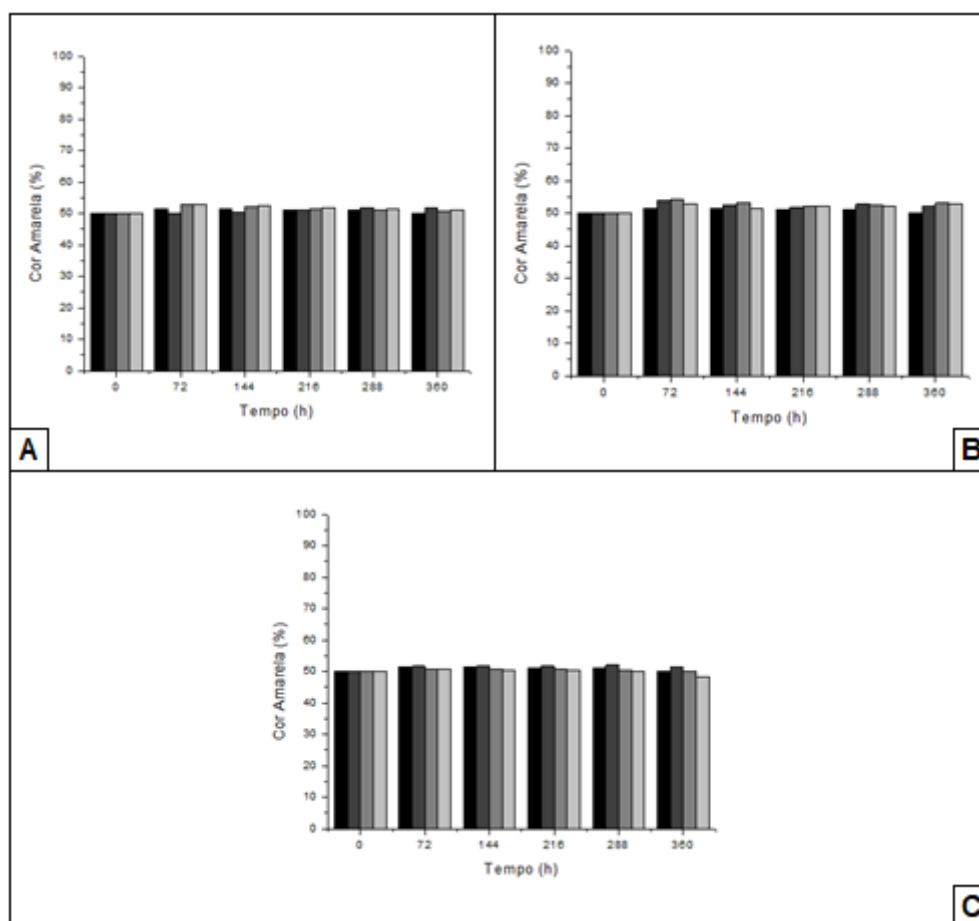
No que diz respeito ao percentual de variação de T ( $\% \Delta T$ ) ao longo das 360 h de clarificação dos hidroméis com adição de bentonite hidratada ou carvão ativado na concentração de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  proporcionou aumentos dos valores de T ao longo do processo de clarificação, enquanto que a adição de maiores concentrações ( $1,5$  ou  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) de um destes compostos ocasionou reduções nos valores do referido parâmetro. O carvão ativado, na concentração de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , foi o único clarificante que proporcionou uma redução de  $\% \Delta T$  ( $-7,5 \pm 0,4\%$ ) mais intensa do que a naturalmente ocorrida no ensaio controle ( $-3,5 \pm 0,4\%$ ), indicando o potencial do clarificante, na concentração mencionada, na diminuição da tonalidade de bebidas alcoólicas como o hidromel.

Ainda no tocante ao percentual de variação de T ( $\% \Delta T$ ), todos os hidroméis com CMC apresentaram aumentos no valor do referido parâmetro, mais especificamente entre  $2,2 \pm 0,4\%$  e  $6,2 \pm 0,4\%$ , para os hidroméis com  $0,5$  e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de CMC. Isto indica que a CMC possui efeito eficaz no aumento dos valores de I e T dos hidroméis submetidos à clarificação na obtenção de bebidas alcoólicas.

A Figura 43 e a Tabela 29 apresentam os valores do percentual da cor amarela ( $\% \text{Amarelo}$ ), bem como as suas variações, durante o processo de clarificação dos hidroméis.



**Figura 43:** Perfis do percentual da cor amarela do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de 0,5 g.L<sup>-1</sup> (▣), 1,5 g.L<sup>-1</sup> (▤) e 2,5 g.L<sup>-1</sup> (▥) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C).



Fonte: O autor.

**Tabela 29:** Valores e variações do percentual da cor amarela (%Amarelo), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

Clarificante	Concentração de clarificante (g.L <sup>-1</sup> )	%Amarelo ± D. P. <sup>a</sup> (0 h)	%Amarelo ± D. P. <sup>a</sup> (288 h)	Percentual de variação de %Amarelo (%ΔAmarelo) ± D. P. <sup>a</sup> , de 0 a 360 h	Percentuais mínimo (%Amarelo <sub>mín</sub> ) e máximo (%Amarelo <sub>máx</sub> ) da cor amarela		
					%Amar	%Amar	Tempo (s) (h)
					elo <sub>mín</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	elo <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	
Nenhum	0	50,1 ± 0,0	50,0 ± 0,3	-0,2 ± 0,5	50,0 ± 0,3	51,4 ± 0,3	360 e 72
Bentonite	0,5	50,1 ± 0,0	51,8 ± 0,3	3,4 ± 0,5	49,9 ± 0,2	51,8 ± 0,3	288 e 360
	1,5	50,1 ± 0,0	50,8 ± 0,3	1,4 ± 0,5	50,1 ± 0,2	52,9 ± 0,3	0 e 72

					0,0	0,3	
	2,5	50,1 ± 0,0	51,1 ± 0,3	2,0 ± 0,5	50,1 ± 0,0	52,9 ± 0,3	0 e 72
<b>CMC</b>	0,5	50,1 ± 0,0	52,1 ± 0,3	4,0 ± 0,5	50,1 ± 0,0	54,0 ± 0,3	0 e 72
	1,5	50,1 ± 0,0	53,0 ± 0,3	5,8 ± 0,5	50,1 ± 0,0	54,3 ± 0,3	0 e 72
	2,5	50,1 ± 0,0	53,0 ± 0,3	5,8 ± 0,5	50,1 ± 0,0	53,0 ± 0,3	0 e 360
	0,5	50,1 ± 0,0	51,6 ± 0,3	3,0 ± 0,5	50,1 ± 0,0	52,1 ± 0,3	0 e 288
<b>Carvão ativado</b>	1,5	50,1 ± 0,0	50,1 ± 0,3	0,0 ± 0,5	50,1 ± 0,0	50,8 ± 0,3	0 e 72
	2,5	50,1 ± 0,0	48,3 ± 0,2	-3,6 ± 0,3	48,3 ± 0,2	50,9 ± 0,3	360 e 72

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão.

**Fonte:** O autor.

A adição de CMC aos hidroméis estimulou o aumento do %Amarelo dos mesmos (Figura 43-B), visto que, em praticamente todo o processo de clarificação dos hidroméis, os valores de %Amarelo nos ensaios controle foram inferiores aos apresentados nas bebidas com a adição de agentes clarificantes.

Porém isso não ocorreu da mesma maneira no caso dos hidroméis acrescidos de bentonite ou carvão ativado (Figuras 43-A e 43-C) e, tanto nestes hidroméis, quanto naqueles com adição de CMC, aparentemente não houve correlação diretamente proporcional das concentrações dos referidos agentes clarificantes com os valores de %Amarelo.

Na maioria dos hidroméis em processo de clarificação, os valores mínimos de %Amarelo (%Amarelo<sub>min</sub>) ocorreram no início do referido processo (0 h), e a maior parte dos valores máximos do %Amarelo<sub>máx</sub> ocorreram após 72 h de clarificação (Tabela 29). Isto indica que geralmente nas primeiras 72 h de clarificação dos hidroméis ocorrem aumentos consideráveis dos valores do referido parâmetro, sugerindo que os clarificantes, na maioria dos ensaios do presente trabalho, atuaram no aumento de %Amarelo no período inicial da clarificação dos hidroméis.

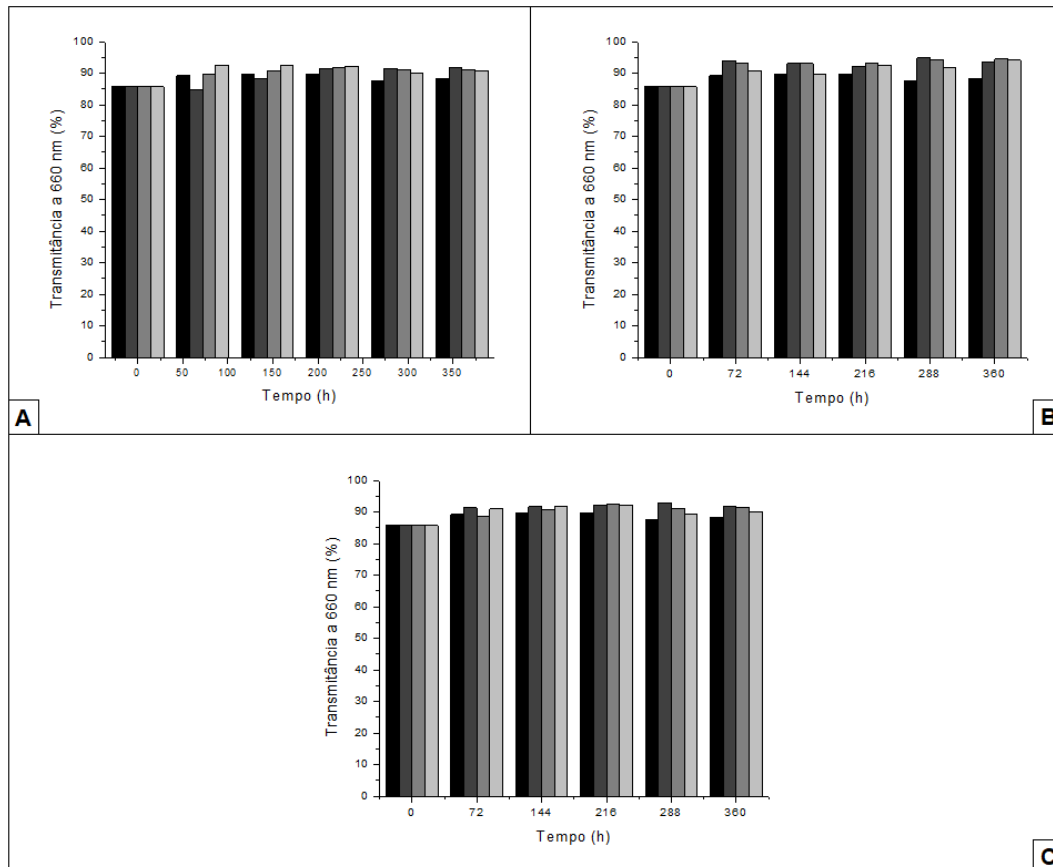
A adição de CMC aos hidroméis proporcionou os maiores valores de %Amarelo<sub>máx</sub>, mais especificamente entre 53,0 ± 0,3% e 54,3 ± 0,3%, nos hidroméis tratados com 2,5 e 1,5 g.L<sup>-1</sup> deste clarificante, após 360 e 72 h de clarificação, respectivamente, enquanto que, nos demais hidroméis, o referido parâmetro variou de 50,8 ± 0,3%, no hidromel com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 72 h de clarificação, até 52,9 ± 0,3%, para os hidroméis tratados com 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de bentonite hidratada, sendo, estes últimos, valores bem próximos aos de %Amarelo<sub>máx</sub> encontrados após 360 h de clarificação do hidromel com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de CMC.

Os percentuais de variação de %Amarelo (% $\Delta$ Amarelo) ao longo das 360 h em que foi conduzido o processo de clarificação dos hidroméis produzidos em escala laboratorial ampliada, a adição de CMC proporcionou os maiores valores do referido percentual, mais especificamente de  $4,0 \pm 0,5\%$ , para os hidroméis contendo  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de CMC, até  $5,8 \pm 0,5\%$ , para os hidroméis com  $1,5$  e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  do referido clarificante.

Nos hidroméis com carvão ativado, o aumento da concentração deste agente clarificante nitidamente influenciou os valores % $\Delta$ Amarelo, visto que, quanto maiores foram as concentrações de carvão ativado, menores foram os valores do referido parâmetro. n os hidroméis tratados com  $0,5$ ,  $1,5$  e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  deste clarificante, os valores de % $\Delta$ Amarelo foram respectivamente iguais a  $3,0 \pm 0,5\%$ ,  $0,0 \pm 0,5\%$  e  $-3,6 \pm 0,5\%$ .

Os valores do percentual de transmitância a 660 nm (%Trans660), além das variações deste parâmetro durante a clarificação de hidroméis estão apresentados na Figura 44 e na Tabela 30, a seguir.

**Figura 44:** Perfis do percentual de transmitância a 660 nm do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada durante a clarificação sem (■) e com a adição de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  (■),  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  (■) e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  (■) de bentonite hidratada (A), carboximetilcelulose (B) e carvão ativado (C).



Fonte: O autor.

**Tabela 30:** Valores e variações da transmitância a 660 nm (%Trans660), durante a clarificação de hidroméis sem e com adição de agentes clarificantes como bentonite hidratada, carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado, em concentrações iguais a 0,5, 1,5 e 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

Clarificante	Concentração de clarificante (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	%Trans 660 ± D. P. <sup>a</sup> (0 h)	%Trans 660 ± D. P. <sup>a</sup> (360 h)	Percentual máximo de Transmitância a 660 nm (%Trans660 <sub>máx</sub> )		Percentual de aumento de %Trans 660 (%ΔTrans 660)	
				%Trans 660 <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>	Tempo (h)	%ΔTrans s660 (0 a 360 h) ± D. P. <sup>a</sup>	%ΔTrans 660 <sub>máx</sub> ± D. P. <sup>a</sup>
Nenhum	0	85,7 ± 0,0	88,4 ± 0,4	89,6 ± 0,4	216	3,2 ± 0,4	4,3 ± 0,4
Bentonite	0,5	85,7 ± 0,0	91,6 ± 0,5	91,6 ± 0,5	360	6,9 ± 0,5	6,9 ± 0,5
	1,5	85,7 ± 0,0	91,0 ± 0,5	91,8 ± 0,5	216	6,2 ± 0,5	7,1 ± 0,5
	2,5	85,7 ± 0,0	90,8 ± 0,5	92,5 ± 0,5	72	6,0 ± 0,5	7,9 ± 0,5
CMC	0,5	85,7 ± 0,0	93,7 ± 0,5	94,8 ± 0,5	288	9,3 ± 0,5	10,6 ± 0,5
	1,5	85,7 ± 0,0	94,6 ± 0,5	94,6 ± 0,5	360	10,4 ± 0,5	10,4 ± 0,5
	2,5	85,7 ± 0,0	94,1 ± 0,5	94,1 ± 0,5	360	9,8 ± 0,5	9,8 ± 0,5
Carvão ativado	0,5	85,7 ± 0,0	91,6 ± 0,5	92,9 ± 0,5	288	6,9 ± 0,5	8,4 ± 0,5
	1,5	85,7 ± 0,0	91,5 ± 0,5	92,5 ± 0,5	216	6,8 ± 0,5	7,9 ± 0,5
	2,5	85,7 ± 0,0	90,0 ± 0,5	92,2 ± 0,5	216	5,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão.

**Fonte:** O autor.

A adição de CMC ou carvão ativado aos hidroméis proporcionou o aumento dos valores de %Trans660. Em praticamente durante todo o período de clarificação, os valores do referido parâmetro nos ensaios controle foram inferiores aos obtidos nos hidroméis em que os referidos clarificantes foram adicionados, conforme as Figuras 44-B e 44-C.

Quanto maior sejam os valores de %Trans660 numa bebida, menor será a turbidez da mesma, assim a adição de CMC ou carvão ativado nos hidroméis, independentemente da concentração do clarificante ou do tempo de atuação dos mesmos, proporcionou a redução da turbidez nas bebidas. Porém, isso não ocorreu da mesma forma nos hidroméis tratados com

bentonite, onde apenas a partir de 216 h os valores de %Trans660 se apresentaram inferiores aos encontrados nos demais hidroméis (estes com adição de agentes clarificantes).

Os valores máximos de %Trans660 (%Trans660<sub>máx</sub>), dos hidroméis contendo CMC apresentaram os maiores valores do referido percentual, mais especificamente entre  $94,1 \pm 0,5\%$  e  $94,8 \pm 0,5\%$ , correspondendo a valores de % $\Delta$ Trans660<sub>máx</sub> iguais a  $9,8 \pm 0,5\%$  e  $10,6 \pm 0,5\%$ , para os hidroméis contendo 2,5 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> do referido clarificante, após 360 e 288 h em relação ao início do processo de clarificação dos hidroméis, respectivamente (Tabela 30). Sendo assim, a CMC foi o clarificante que proporcionou a maior redução da turbidez dos hidroméis produzidos em escala laboratorial ampliada, na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>, após 288 h do início do processo de clarificação.

Os valores de %Trans660<sub>máx</sub> para os demais hidroméis, variaram de  $89,6 \pm 0,4\%$  (% $\Delta$ Trans660<sub>máx</sub> igual a  $4,3 \pm 0,4\%$ ), no hidromel referente ao ensaio controle, após 216 h em relação ao início do processo de clarificação, até  $92,9 \pm 0,5\%$  (% $\Delta$ Trans660<sub>máx</sub> igual a  $8,4 \pm 0,5\%$ ), no caso do hidromel contendo 0,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 288 h de clarificação. Aparentemente não houve uma correlação diretamente proporcional do aumento das concentrações dos agentes clarificantes adicionados aos hidroméis (incluindo a CMC) com o aumento dos valores de %Trans660<sub>máx</sub> e % $\Delta$ Trans660<sub>máx</sub>.

Maiores valores de percentuais de aumento de %Trans660 (% $\Delta$ Trans660) durante as 360 h em que a clarificação dos hidroméis foi conduzida, foram encontrados nos hidroméis tratados com CMC, mais especificamente de  $93,7 \pm 0,5\%$  (% $\Delta$ Trans660 igual a  $9,3 \pm 0,5\%$ ), para os hidroméis tratados com 0,5 g.L<sup>-1</sup> deste agente clarificante, até  $(94,6 \pm 0,5)\%$  (% $\Delta$ Trans660 igual a  $10,4 \pm 0,5\%$ ), para o hidromel tratado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de CMC.

Nos outros hidroméis, os valores de % $\Delta$ Trans660 variaram de  $88,4 \pm 0,4\%$  (% $\Delta$ Trans660 igual a  $3,2 \pm 0,4\%$ ), para o hidromel sem adição de clarificantes (ensaio controle), até  $91,6 \pm 0,5\%$  (% $\Delta$ Trans660 igual a  $10,4 \pm 0,5\%$ ), para o hidroméis tratados com 0,5 g.L<sup>-1</sup> de bentonite hidratada e de carvão ativado.

Constatou-se que a CMC foi o melhor agente para a clarificação dos hidroméis produzidos em escala laboratorial ampliada, proporcionando maiores reduções na turbidez e os maiores valores de % $\Delta$ Trans660 e % $\Delta$ Trans660<sub>máx</sub>, sendo que, ao final de 360 h, o hidromel tratado com 1,5 g.L<sup>-1</sup> de CMC apresentou maior valor de % $\Delta$ Trans660 sendo selecionado para a realização de análises necessárias para a caracterização físico-química, a fim de verificar e atestar a qualidade final do produto.

### 5.3.3.3. Caracterização físico-química do hidromel clarificado

A Tabela 31, a seguir, detalha os resultados das análises físico-químicas realizadas no hidromel, produzido em escala laboratorial ampliada, e clarificado com carboximetilcelulose (CMC) a  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ , por 360 h, bem como os valores de referência estabelecidos pela Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008.

**Tabela 31:** Valores experimentais dos parâmetros físico-químicas do hidromel produzido em escala laboratorial ampliada e clarificado com carboximetilcelulose ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), e os respectivos valores de referência para verificação da conformidade da qualidade desta bebida alcoólica, conforme a Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008.

Parâmetro físico-químico	Valor experimental $\pm$ D. P. <sup>a</sup>	Valor de referência
Graduação alcoólica (% v/v)	$13,9 \pm 0,1$	4,0 - 14,0
Acidez total ( $\text{meq.L}^{-1}$ )	$101,2 \pm 1,7$	Máx. 130,0
Acidez fixa ( $\text{meq.L}^{-1}$ )	$90,4 \pm 1,0$	Mín. 30,0
Acidez volátil ( $\text{meq.L}^{-1}$ de ácido acético)	$10,8 \pm 0,7$	Máx. 20,0
Extrato seco reduzido ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$10,6 \pm 0,1$	Mín. 7,0
pH	$4,6 \pm 0,0$	---
Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)	$15,6 \pm 0,1$	---
Açúcares redutores ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$55,2 \pm 0,3$	---
Açúcares totais ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$119,3 \pm 1,3$	---
Compostos fenólicos totais ( $\text{mg.L}^{-1}$ de ácido gálico)	$229,8 \pm 2,2$	---

<sup>a</sup> D. P. = Desvio-padrão.

**Fonte:** O autor.

Os parâmetros físico-químicos avaliados do hidromel clarificado, conforme a Tabela 31, estão de acordo com o que a Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008 exige para atestar a qualidade do referido produto.

Os valores do teor volumétrico de etanol, da concentração de açúcares redutores totais e o teor de sólidos solúveis (TSS) totais do hidromel diminuíram um pouco após o processo de clarificação, mais precisamente de  $14,1 \pm 0,1\% \text{ v/v}$  para  $13,9 \pm 0,1\% \text{ v/v}$ , no teor de etanol, de  $62,2 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$  para  $55,2 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ , nas concentrações de açúcares redutores totais, e de  $15,9 \pm 0,1 \text{ °Brix}$  para  $15,6 \pm 0,1 \text{ °Brix}$ , no TSS totais.

Na Tabela 32 estão relacionados os parâmetros físico químicos apresentados na Tabela 31, e os encontrados em hidroméis preparados em larga escala (laboratorial ampliada ou piloto) e os reportados na literatura.

**Tabela 32:** Parâmetros físico-químicos do hidromel produzido no presente trabalho, em escala laboratorial ampliada e clarificado com carboximetilcelulose (1,5 g.L<sup>-1</sup>), e os reportados nos hidroméis finais referentes a trabalhos de outros autores.

<b>Parâmetro físico-químico</b>	Presente trabalho <sup>a</sup>	Amorim (2017)	Barrios <i>et al.</i> (2010) <sup>b</sup>	Brunelli (2015) <sup>b</sup>	Ferraz (2015)	Ukpabi (2006) <sup>b</sup>
<b>Graduação alcoólica (% v/v)</b>	13,9 ± 0,1	14,44	10	13,78 - 14,75	8,9 - 9,6	12,70 - 15,01
<b>Acidez total (meq.L<sup>-1</sup>)</b>	101,2 ± 1,7	---	92,5	78,13 - 92,63	32,87 - 40,40	23,33
<b>Acidez fixa (meq.L<sup>-1</sup>)</b>	90,4 ± 1,0	---	82,5	66,23 - 77,47	27,66 - 35,57	---
<b>Acidez volátil (meq.L<sup>-1</sup> de ácido acético)</b>	10,8 ± 0,7	---	10,0	10,82 - 15,12	3,17 - 5,21	---
<b>Extrato seco reduzido (g.L<sup>-1</sup>)</b>	23,4 ± 0,2	---	---	31,54 - 41,34	19,29 - 26,34	---
<b>pH</b>	4,6 ± 0,0	---	---	3,42 - 3,81	---	3,65 - 3,67
<b>Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)</b>	15,6 ± 0,1	13,1 - 13,3	1,8	---	---	---
<b>Açúcares redutores (g.L<sup>-1</sup>)</b>	55,2 ± 0,3	---	---	0,43 - 0,61	5,91 - 11,74	---
<b>Açúcares totais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	129,3 ± 1,3	---	---	---	---	---
<b>Compostos fenólicos totais (mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico)</b>	229,8 ± 2,2	---	---	---	195,54 - 306,62	---

<sup>a</sup> Dados expressos em valores médios ± desvio-padrão.

<sup>b</sup> Em parte dos dados, foram realizadas conversões das unidades de medida originais para as mesmas dos valores experimentais do presente trabalho.

**Fonte:** O autor.

Os teores de etanol reportados em trabalhos da literatura foram, em sua maioria, semelhantes aos verificados no presente trabalho (13,9 ± 0,1)% v/v, com exceção dos valores reportados por Ferraz (2015) (8,9 a 9,6 % v/v), porém, no caso do referido autor, apesar da fermentação dos mostos de mel ter sido mais demorada (cerca de 5 vezes maior em relação ao tempo da fermentação do mosto de mel em escala piloto realizada no presente trabalho), os suplementos utilizados (Enovit®, sais inorgânicos e/ou pedaços de maçãs cortadas) pelos mesmos foram mais pobres em nutrientes do que os do presente trabalho (graviola, extrato de feijão-caupi e sais inorgânicos como o sulfato de magnésio e o cloreto de amônio), conforme

a Tabela 32. Isto confirma a importância da suplementação do mosto de mel para o estímulo do processo fermentativo.

Os teores de açúcares totais e redutores, além dos TSS totais e extrato seco reduzido, fatores acima mencionados também podem ter sido responsáveis pelas diferenças encontradas nos referidos parâmetros físico-químicos no hidromel produzido no presente trabalho com os encontrados nos hidroméis produzidos nos trabalhos dos referidos autores.

As diferenças encontradas nos teores de acidez (fixa, volátil e total) dos hidroméis referentes aos trabalhos dos autores mencionados (Tabela 32) com os encontrados no presente trabalho podem ter sido ocasionadas por diversos fatores que vão desde a suplementação do mosto de mel, até as próprias características específicas (incluindo a formação de produtos secundários de fermentação, como o ácido acético) de cada cepa de levedura utilizada em relação à fermentação alcoólica dos açúcares presentes nos mostos de mel.

O hidromel referente ao trabalho de Barrios *et al.* (2010) possuiu um valor de TSS totais bastante inferior (10,4 °B, ou 18,72°Brix) do mosto de mel sendo bastante inferior ao do mosto de mel, fermentado em escala laboratorial ampliada, referente ao presente trabalho (30,0°Brix).

Os fatores supracitados também podem ter sido influenciados pelas diferenças de pH encontradas nos referidos hidroméis, porém, neste caso, o pH inicial de fermentação exerceu uma considerável influência, visto que o pH inicial do mosto de mel, fermentado em escala laboratorial ampliada, no presente trabalho, foi igual a 4,9, enquanto que os valores iniciais de pH dos mostos de mel referentes aos trabalhos de Brunelli (2015) foram iguais a 3,72. Ou seja, geralmente quanto menor os valores iniciais de pH de um mosto de mel, menores serão os valores de pH dos hidroméis obtidos a partir dos mesmos.

No tocante aos teores de compostos fenólicos totais, os mesmos, no hidromel referente trabalho, ( $229,8 \pm 2,2$ ) mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico, foram superiores às menores concentrações (195,54 mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico) encontradas nos hidroméis referentes ao trabalho de Ferraz (2015), porém inferiores às maiores concentrações destes compostos nos hidroméis do trabalho do referido autor.

O fato do hidromel produzido, em escala laboratorial ampliada a partir de um mosto de mel suplementado com graviola, a presença do referido fruto que possui uma concentração de compostos fenólicos igual a ( $1345,0 \pm 65,0$ ) mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 14) faz com que o hidromel contenha um teor superior dos referidos compostos àqueles hidroméis cujo(s) suplemento(s) utilizado(s) para o preparo dos mesmos não seja(m) rico(s) nestes compostos.



Os altos teores de compostos fenólicos em algumas amostras de hidromel, no trabalho de Ferraz (2015) se devem ao envelhecimento dos mesmos, por 7 meses, em tonel de carvalho que é uma madeira rica em compostos fenólicos.

## 6. CONCLUSÃO

As matérias-primas utilizadas para a produção dos hidroméis, são boas fontes de nutrientes que, utilizados pelas leveduras, podem aprimorar o processo fermentativo dos mostos de mel para a produção de hidromel. O mel e a graviola se mostraram boas fontes de açúcares e compostos fenólicos, enquanto que o feijão-caupi se destacou por se mostrar uma fonte rica em proteínas, com potencial de ser utilizado como suplementação dos referidos nutrientes no mosto de mel.

A cepa comercial da levedura *S. bayannus* Premier Cuvée® é mais adequada para ser utilizada para a produção de hidromel, se comparado as cepas comerciais Cotê des Blancs® (*S. bayannus*) e Safbrew Abbaye (*S. cerevisiae*).

A suplementação dos mostos de mel com extrato de feijão-caupi mostrou-se eficaz no que diz respeito ao estímulo das leveduras ao consumo dos açúcares fermentescíveis presentes nos mostos e à produção de etanol, sendo que a maior concentração (30 g.L<sup>-1</sup>) do referido extrato produziu hidroméis contendo maiores teores de etanol, sendo assim a concentração ideal para as fermentações subsequentes dos mostos de mel.

A adição de graviola adicionada na concentração de 16,55% m/v (75% m/m de polpa líquida e 25% m/m de porção fibrosa), e o pH inicial igual a 4,86, proporcionaram o valor ótimo de produtividade volumétrica de etanol nos mostos de mel fermentados.

Obteve-se um hidromel com teor volumétrico e concentração final de etanol iguais a (14,1 ± 0,1)% v/v e (110,9 ± 0,8) g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, e produtividade volumétrica de etanol igual a (0,385 ± 0,003) g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, na fermentação em escala laboratorial de bancada.

Um hidromel mais límpido foi obtido com a adição de CMC na concentração de 1,5 g.L<sup>-1</sup>, como aumento da transmitância a 660 nm foi de 10,4 ± 0,5%.

O hidromel clarificado apresentou conformidade em todos os parâmetros mencionados de acordo com a Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008, que estabelece o regulamento técnico para esta bebida alcoólica.

É possível produzir hidromel utilizando graviola e extrato de feijão caupi como suplementos, substituindo suplementos tradicionais normalmente utilizados na produção de

hidroméis, assim diminuindo os custos do processo fermentativo e proporcionando um melhor aproveitamento das referidas matérias-primas.

Recomenda-se, para trabalhos futuros, o estudo da viabilidade econômica do processo de produção do hidromel, bem como o estudo dos efeitos de diferentes tipos de mel, leveduras e suplementos sob a forma de frutas, grãos, ervas, dentre outras matérias-primas que sejam abundantes na região onde a referida bebida será elaborada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWOLE, S. O.; CAXTON-MARTINS, E. A. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 173-187, jan. 2006.

AMORIM, T. S. **Avaliação da fermentação do mosto de mel suplementado com polpa de acerola por *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017. 116 p.

AMORIM, T. S.; LOPES, S. B.; BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; CARVALHO, G. B. M.; MARTÍNEZ, E. A. Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 561-569, nov. 2018.

ANACLETO, D. A.; MARCHINI, L. C. Composição físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. provenientes do cerrado paulista. **Boletim de indústria animal**, Nova Odessa, v. 61, n. 2, p. 161-172, 2004.

ANAYA-ESPARZA, L. M.; MÉNDEZ-ROBLES, M. D.; PÉREZ-LARIOS, A.; YAHIA, E. M.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Nutritional composition and physicochemical parameters of thermosonicated soursop néctar. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, n. 1, p. 5-13, ago. 2018.

ANUNCIAÇÃO, A. S.; MARTINS, J. A.; AMORIM, T. S.; CARVALHO, G. B. M.; MARTÍNEZ, E. A. Polpa de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) na produção de hidromel. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 441-445, 2017.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. v. 4. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. 523 p.

AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - ASBC. **Methods of Analysis of American Society of Brewing Chemists**. 8.ed. Minnesota: Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.

BALOGU, T. V.; TOWOBOLA, O. Production and quality analysis of wine from honey and coconut milk blend using *Saccharomyces cerevisiae*. **Fermentation**, v. 3, n. 2, abr. 2017.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, new Delhi, v. 45, n. 5, p. 480-485, maio 2007.

BARBOSA, C.; LAGE, P.; VILELA, A.; MENDES-FAIA, A.; MENDES-FERREIRA, A. Phenotypic and metabolic traits of commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. **AMB Express**, v. 4, n. 1, maio 2014.

BARRIOS, C; PRINCIPAL, J.; SÁNCHEZ, J; GUÉDEZ, J. C. Caracterización físico-química y análisis sensorial de un Hidromiel elaborado de manera artesanal. **Zootecnia Tropical**, v. 28, n. 3, p. 313-319, set. 2010.

BAYMA, A. B. **Perfil sensorial e instrumental de méis silvestres de abelhas africanizadas (*Apis mellífera*) das cinco mesorregiões do estado de Maranhão**. Tese de Doutorado UFRRJ, Soropédica, RJ, 2008.

BERTONCELI, J.; DOBERŠEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BIANCHI, E. M. **La miel, características y composición: análisis y adulteraciones**. Santiago del Estero: UNSE – CEDIA, 1981.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em 20 maio 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Brasília, 2000. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008**. Regulamento Técnico do Feijão. Brasília, 2008a. Disponível em: < <http://www.codapar.pr.gov.br/arquivos/File/pdf/FeijaoInstrucaoNormativa1208.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº 94, de 30 de agosto de 2016**. Complementação dos padrões de identidade e qualidade de polpa de fruta. Disponível em: < [http://www.agricultura.gov.br/acesso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/documentos/01\\_09-secao-1-portaria-58.pdf](http://www.agricultura.gov.br/acesso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/documentos/01_09-secao-1-portaria-58.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008**. Regulamento técnico para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. Brasília, 2008b. Disponível em: < <http://www.aladi.org/nfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/ef1ee2d7248768860325>>

7a9f004bbf57/\$FILE/ATTPLES5.pdf/Portaria%20N%C2%B0%2064-2008.pdf f>. Acesso em: 20 maio 2018.

BRUNELLI, L. T. **Caracterização físico-química, energética e sensorial de hidromel**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 2015. 85 p.

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

CASTELLÓN, R. E. R.; ARAÚJO, F. M. M. C.; RAMOS, M. V.; NETO, M. A.; FILHO, F. R.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B. S. Composição elementar e caracterização da fração lipídica de seis cultivares de caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.1, p.149-153, abr. 2003.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; ALMEIDA E SILVA; J. B. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro: 2ª parte – A Fermentação. **Analytica**, n. 26, jan. 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC. v. 3, Suppl. 2., ed. 1. Roma: FAO/WHO, 1989. p. 17-21.

CZABAJ, S.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A. Z.; KLIKS, J. Effects of Mead Wort Heat Treatment on the Mead Fermentation Process and Antioxidant Activity. **Molecules**, v. 22, n. 5, maio 2017.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, Ottawa, n. 44, n. 7, p.1671-1701, ago. 2011

DŽUGAN, M.; TOMCZYK, M.; SOWA, P.; GRABEK-LEJKO, D. Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. **Molecules**, v. 23, n. 8, ago. 2018.

ELBANNA, K.; ATTALLA, K.; ELBADRY, M.; ABDELTAWAB, A.; GAMAL-ELDIN, H.; RAMADAN, M. F. Impact of floral sources and processing on the antimicrobial activities of different unifloral honeys. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 3, p. 194-200, jun. 2014.

FARZANA, W.; KHALIL, I. A. Protein quality of tropical food legumes. **Journal of Science and Technology**, v. 23, p. 13-19, 1999.

FATTORI, S. B. **La miel**: Propriedades, composición y Análisis Físico-Químico. Buenos Aries: Apimondia, 2004. 81 p.

FERRAZ, F. O. **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015. 129 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 196 p.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos**: temas atuais. São Paulo: Varela, 2003.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, dez. 1983.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. D.; ROCHA, M. M.; DAMASCENO-SILVA; K. J.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-Caupi no Brasil**: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 9, p. H235-H240, Nov./Dez. 2008.

FROTA, K. de M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. **Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 2, abr./jun. 2008.

FU, B.; NELSON, P. E.; IRVINE, R.; KANACH, I. I. Processing of nutritious, safe and acceptable foods from CEISS candidate crops. **Advance Space Research**, v. 18, n. 1-2, p. 241-250, 1996.

GEORGÉ, S., BRAT; P.; ALTER P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.5, p. 1370-1373, mar. 2005.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, T. R. S.; FRANÇA, F. GUEDES, M. L.; AMORIM, A. M. Flora da Bahia. **Sitientibus, série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 169 – 173, 2006.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie mesure, origine et interpretation. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, v. 18, n. 4, p. 253-271, dez. 1984.

GÖKMEN V.; AÇAR, Ö. Ç.; KÖKSEL, H.; ACAR, J. Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1136–1142, 2007.

GÖKMEN, V.; AÇAR, Ö. Ç.; SERPEN, A.; MORALES, F. J. Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 5, p. 1031–1037, mar. 2008.

GOMES, T.; BARRADAS, C.; DIAS, T.; VERDIAL, J.; MORAIS, J. S.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L. M. Optimization of mead production using response surface methodology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 680–686, 2013.

GOMES, T.; DIAS, T.; CADAVEZ, V.; VERDIAL, J., MORAIS, J. S., RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L.M. Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 137–142, jun. 2015.

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

GUPTA, J. K.; SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. **Natural Products Radiance**, v.8, n.4, p.345-355, 2009.

GUPTA, P.; SINGH, R.; MALHOTRA, S.; BOORA, K.S.; SINGAL, H.R. Cowpea [*Vigna Unguiculata* (L.) Walp.] Seed Proteins: Heterogeneity in Total Proteins and Proteins Fractions, v. 37, p. 62-67, 2014.

GYAMFI, K.; SARFO, D.; NYARKO, B.; AKAHO, E.; SERFOR-ARMAH, Y.; AMPOMAH-AMOAKO, E. Assessment of elemental content in the fruit of graviola plant, *Annona muricata*, from some selected communities in ghana by instrumental neutron activation analysis. **Elixir Food Science**, v. 41, p. 5671–5675, nov. 2011.

HAMELINK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, abr. 2005.

HORN, H. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., Teresina, 1996. **Anais...** Teresina: FBA, 1996. p. 403-429.

ILHA, E. C.; BERTOLDI, F. C.; REIS, V. D. A.; SANT'ANNA, E. Rendimento e Eficiência da Fermentação Alcoólica na Produção de Hidromel. Corumbá: Embrapa Pantanal, dez. 2008. 14 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p.1020.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 331-335, jul. 2006.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; SHAH, H. Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer, Sarhad. **Journal of Agriculture**, Peshawar, v. 19, n. 1, p. 127-134, 2003.

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

JOSHI, V. K.; SHANDU, D. K.; THAKUR, N. S. Fruit based alcoholic beverages. In: JOSHI, V. K.; PANDEY, A. **Biotechnology: food fermentation (microbiology, biochemistry and technology)**, v. 2. New Delhi: Educational Publishing and Distributors. p. 647-744.

KAHOUN, D.; ŘESKOVÁ, S.; KRÁLOVSKÝ, J. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. **Food Chemistry**, v. 219, p. 357-363, 2017.

KOGUCHI, M.; SAIGUSA, N.; TERAMOTO, Y. Production and Antioxidative Activity of Mead Made From Honey and Black Rice (*Oryza sativa* var. Indica cv. Shiun). **Journal of the Institute of Brewing**, v.115, n.3, p.238-242, 2009.

KOBLITZ, M. G. B. Carboidratos. In: KOLBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 19-76.

KUSTER, B. F. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A review focussing on its manufacture. **Starch Stärke**, v. 42, n. 8, p. 314–321, jan. 1990.

LEE, H. S.; NAGY, S. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 14, n. 3, p. 171–178, jun. 1990.

LEMOS, E. E. P. A produção de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 77-85, jan. 2014.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGÍRCOLA. Rio de Janeiro: IBGE, v. 17, 2005; v. 18, 2006; v. 19, 2007; v. 20, 2008; v. 21, 2009.

LIMA, D. G.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. V.; FARFÁN, J. A.; NONATO, C. T.; LIMA, M. T.; SALAY, E.; COLAGNUTI, F. A. B.; GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP**. 4. ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 161 p.

LIMA, M. A. C.; ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; LIMA, J. R. G. Uso de cera e 1-metilciclopropeno na conservação refrigerada de graviola (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 433-437. 2004.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. 593 p.

MARKOWICZ, D. B.; MONARO, E.; SIGUEMOTO, E.; SÉFORA, M.; VALDEZ, B. Maillard reaction products in processed foods: pros and cons. In: VALDEZ, B. **Food industrial processes-methods and equipment**. 1 ed. Rijeka: InTech, 2012. p. 281–300.

MARTÍNEZ, A. M.; VIVAS, G. J.; QUICAZAN, M. C. Evaluation of Alcoholic Fermentation During the Production of Mead Using Immobilized Cells in Kappa-Carrageenan. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 19-24, abr. 2016.

MASCARENHAS, A. M. O.; AMORIM, T. S.; ANUNCIACÃO, A. S.; ALBINATI, F. L.; MARTÍNEZ, E. A. Produção de hidromel: efeito da concentração da polpa de abacaxi (*Ananas mill*). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 436-440, 2017.

MATOS, R. A. **Desenvolvimento e mapa de preferência externo de bebida láctea à base de soro e polpa de graviola (*Annona muricata*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2009.

MENDES-FERREIRA, A.; COSME F.; BARBOSA C.; FALCO, A. I V.; MENDESFAIA, A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces*

cerevisiae for mead production. **Journal Internacional de Microbiologia de alimentos**, v. 144, n. 1, p.193-198, nov. 2010.

MISHRA, S.; AHMAD, S.; KUMAR, N.; SHARMA, B. K. *Annona muricata* (the cancer killer): A review. **The Global Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1613–1618, jan. 2013.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, jul. 2015.

MORAES, F. J.; GARCIA, R. C.; VASCONCELOS, E.; CAMARGO, S. C.; PIRES, B. G.; HARTLEBEN, A. M.; LIESENFELD, F.; PEREIRA, D. J.; MITTANCK, E. S.; GIANSSON, J.; GREMASCHI, J. R. Caracterização físico-química de amostras de mel de abelha africanizada dos municípios de Santa Helena e Terra Roxa (PR). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1269-1275, 2014.

MOREIRA, P. X.; BARBOSA, M. M.; GALLÃO, M. I.; LIMA, A. C.; AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. Estrutura e Composição Química do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). In: BRITO, E. S. **Feijão-Caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 270-276, abr.-jun. 2006

NAVRÁTIL, M.; STURDÍK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeasts. **Biotechnology Letters**, v.23, p. 977–982, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 907 p.

NUNES, D. L. **Preparação de carvão ativado a partir de torta prensada de *Raphanus sativus* L. e utilização para clarificação de soluções**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. 2009. 117 p.

NUNES, C. R. ***Annona muricata* L.: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011. 126 p.

OLIVEIRA, P. P.; SANTOS, F. A. R. **Prospecção palinológica em méis da Bahia**. Feira de Santana: Print Mídia, 2014. 120 p.

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

ONWULIRI, A. V.; OBU, A. J. Lipids and other constituents of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* grown in northern Nigéria. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 1-7, 2002.



PENNA, A. L. B. **Hidrocolóides**: Usos em Alimentos. Caderno de Tecnologia & Bebidas. São José do Rio Preto: UNESP, 2004.

PERALTA, E. D.; KOBLITZ, M.G. B. Mel. In: KOLBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias**: composição e controle de qualidade. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 267-289.

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

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J. M.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA; A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 21-30, abr. 2014.

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA; A. Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 121, n. 3, p. 405-410, jun. 2015.

PHILLIPS, R.D.; MCWATTERS, K.H.; CHINNAN, M.S.; HUNG, Y.C.; BEUCHAT, L.R.; SEFA- DEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N.S.; LIU, K.; MENSA- WILMOT, Y.; NNANNA, I.A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F.K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, p. 193-213, 2003.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. CRC Press: Cambridge, 2000.

QURESHI, N.; TAMHANE, D.V. Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 27-30, out. 1987.

REED, B.J.; HENDRIX Jr., C.M.; HENDRIX, D.L. **Quality Control for Citrus Processing Plants**. v. 1. Florida: Intercit, 1986.

RICHTER, W.; JANSEN, C.; VENZKE, T. S. L.; MENDONÇA, C. R. B.; BORGES, C. D. Avaliação da qualidade físico-química do mel produzido na cidade de Pelotas/RS. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 22, n. 4, p. 547-553, out./dez. 2011.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009. 358 p.

ROHR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Instituto de Tecnologia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. 98 p.

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

SACRAMENTO, C. K.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L.; BARRETO, W. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 329-331, ago. 2003.

SÃO JOSÉ, A. R. Cultivo e mercado da graviola. 10ª semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria 01 a 04 de setembro de 2003–Centro de Convenções Fortaleza – Ceará – Brasil. FRUTAL 2003 Cooperativismo e Agronegócio.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. 541 p.

SEBRAE. **Agronegócio: Fruticultura**. Boletim de Inteligência, out. 2015. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>. Acesso em: 18 mai. 2016.

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

SINGH, B. B. Cowpea breeding at IITA: highlights of advances impacts. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. **Tecnologias para o agronegócio: anais**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. 1 CD-ROM. (Embrapa Meio-Norte. Documentos, 121).

SINGH, B. B. Recent progress in cowpea genetics and breeding. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 752, p. 69-76, 2007. Edition of the Proceedings of the International Conference on Indigenous Vegetables and Legumes, Hyderabad, India , Sep. 2007. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/752/752\\_7.htm](http://www.actahort.org/books/752/752_7.htm)>. Acesso em: 20 maio 2018.

SIQUEIRA, A. M. O.; MOREIRA, A. C. C. G.; MELO, E. A.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Dietary fibre content, phenolic compounds and antioxidant activity in soursops (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 1020-1026, dez. 2015.

SOBRINHO, R. B. **Potencial de exploração de Anonaceas no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, set. 2010.

SOUZA-SILVA, S. M.; MAIA, J. M.; ARAÚJO, Z. B.; FREIRE-FILHO, F. R. **Composição Química de 45 Genótipos de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, ago. 2002.

SROKA, P.; TUSZYŃSKI. Alterações no conteúdo de ácidos orgânicos durante a fermentação do mosto de hidromel. **Food Chemistry**, v.104, p.1250-1257, 2007.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, T. S. Dosagem de glicídios totais pelo método de antrona. **Journal of Biochemistry**, v. 50, p. 292, 1952.

TSIAPARA, A.; JAAKKOLA, M.; CHINOU, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 702-708, out. 2009.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, jan. 2007.

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

VALADA, I. O. D. G. **Avaliação microbiológica de vinho engarrafado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 2016. 51 p.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

VAUGHAN, A.; O’SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 111, n. 4, p. 355-371, maio 2005.

VIT, P.; SANTIAGO, B.; PÉREZ-PÉREZ, E. M. Chemical composition and antioxidant activity of the pulp, leaves and seeds of soursop *Annona muricata* L. **Interciencia**, v. 35, n. 5, p. 350-353, maio 2014.

WALKER, G. M. **Yeast Metabolism**. In: *Yeast Physiology and Biotechnology* (ed. John Wiley & Sons), p. 203-264, Wiley, Scotland, 2000.

WESOŁOWSKA, M.; DŻUGAN, M. The use of Photochem device in evaluation of antioxidant activity of polish honey. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 1568-1574, p. 1568–1574, nov. 2016.