UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec

Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Biotecnologia de bebidas fermentadas: produção e avaliação de hidromel

Bruno Pedrozo Fernandes de Freitas

Pelotas, 2018

Bruno Pedrozo Fernandes de Freitas

Biotecnologia de bebidas fermentadas: produção e avaliação de hidromel

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Acadêmica: Profª. Drª. Ana Lúcia Soares Chaves
Orientador de Estágio: Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F863b Freitas, Bruno Pedrozo Fernandes de

Biotecnologia de bebidas fermentadas : produção e avaliação de hidromel / Bruno Pedrozo Fernandes de Freitas ; Ana Lúcia Soares Chaves, orientadora. — Pelotas, 2018.

32 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Acidez. 2. Caracterização de leveduras. 3. Análises físico-químicas. I. Chaves, Ana Lúcia Soares, orient. II. Título.

CDD : 663.3

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Bruno Pedrozo Fernandes de Freitas

Biotecnologia de bebidas fermentadas: produção e avaliação de hidromel

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de Novembro de 2018

Banca examinadora:

Profª. Drª. Ana Lúcia Soares Chaves (Orientadora)
PhD em Biologie Céllulaire et Moléculaire Végétale, pelo Institut National Polytechnique de Toulouse, França.

Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso
Doutorado em Sciences Agronomiques, pelo Institut National Polytechnique de Toulouse, França.

Msc. Renan Eugênio Araujo Piraine
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil.
Diretor da Empresa *Yeastech.*

Agradecimentos

A minha namorada, Thissiana, por sempre incitar a seguir meus sonhos, independente das dificuldades. Você é a luz que ilumina meu caminho.

A minha mãe, por todo apoio que me foi dado ao longo dos anos, além do amor e carinho incondicional. Agradeço por ter feito o possível e o impossível por mim.

A profª. Drª. Ana Lúcia Soares Chaves e ao prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso, pela oportunidade e apoio para desenvolver este trabalho. Sou profundamente grato por abraçarem minha causa.

Ao professor Dr. Fábio Leite, por ceder seu laboratório para experimentação e seus conhecimentos acerca do assunto. A oportunidade de estágio durante a graduação possibilitou encontrar minha vocação, e sou extremamente grato quanto a isso.

A equipe do Laboratório de Microbiologia, do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, por todos ensinamentos e conselhos dados durante a graduação. Vocês foram especiais para minha formação.

A empresa *Yeastech*, em especial o diretor Renan Piraine, por todo apoio técnico-científico dado para a execução do presente trabalho. Desejo um futuro resplandecente a vocês.

A todos os outros que não foram citados, por serem inúmeros, agradeço a vocês por todo o apoio dado durante minha formação de uma forma ou outra.

Por fim, agradeço a meu pai, que mesmo não podendo estar presente, foi importante para minha existência.

Obrigado a todos.

Resumo

FREITAS, Bruno Pedrozo Fernandes de. **Biotecnologia de bebidas fermentadas: produção e avaliação de hidromel**. 2018. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A apicultura é uma atividade de grande valia econômica no estado do Rio Grande do Sul, movimentando centenas de milhões de reais por ano. O mel possuí diversas aplicações, sendo a principal no ramo de alimentos, como adoçante e substrato fermentescível. O produto obtido a partir da fermentação do mosto de mel e água é o hidromel, bebida de pouco conhecimento comum no Brasil, que sofre de poucos trabalhos e pesquisas técnico-científicas elaboradas, resultando em grande desconhecimento acerca de características físico-químicos do resultado da fermentação de seu mosto, além da ausência de mais estudos sobre leveduras e caracterização das mesmas em mostos de hidromel. O presente trabalho busca caracterizar o comportamento de quatro cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, baseado na análise do produto obtido por fermentação alcoólica do mosto, em acidez total, medido em gramas de ácido acético por 100 mL, por meio de titulação de neutralização de ácidos; em pH , utilizando um pHmetro de bancada digital; em refratometria, analisando grau Brix (ºBx) inicial e final, com o uso do *software Beersmith™* 3 para o processamento dos dados e obtenção do grau alcoólico, medido em álcool por volume. Foram realizadas fermentações de forma concomitante nas faixas de temperatura de 18 ºC e 28 ºC, inoculando as quatro cepas de levedura, e analisando o mosto pré-inóculo e o produto da fermentação. Na faixa de temperatura de 18 ºC obteve-se um menor grau de acidez, obtendo-se em média 2,17 $g.l^{-1}$ de ácido acético, sendo as cepas *Viking Mead* e YT011 as que atingiram maior e menor acidez respectivamente. Em 18 ºC também foram encontradas as menores graduações alcóolicas, atingindo em média 4,66% de álcool por volume, sendo as cepas *Viking Mead* e YT070 as que atingiram maior e menor graduação alcoólica respectivamente. Ambos os resultados são por conta da estagnação do processo fermentativo, ocasionado pelo estresse em que a levedura foi submetida, provavelmente por conta da citotoxicidade do álcool produzido somado à baixa temperatura de fermentação. Na faixa de 28 ºC, a fermentação deu-se por completa, gerando em média 2,60 $g.l^{-1}$ de ácido acético, sendo as cepas *Viking Mead* e YT011 as que atingiram maior e menor acidez respectivamente. Em 28 ºC a média de graduação alcoólica foi 8,77% de álcool por volume, sendo as cepas YT011 e YT001 as que atingiram maior e menor graduação alcoólica respectivamente.

Palavras-chave: acidez; análises físico-químicas; caracterização de leveduras.

Abstract

FREITAS, Bruno Pedrozo Fernandes de. **Biotechnology of fermented beverages: production and evaluation of mead**. 2018. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Beekeeping is an activity of great economic value in the state of Rio Grande do Sul, moving hundreds of millions of reais per year. The honey has several applications, being the main one in the branch of food industry, working like a sweetener and fermentable substrate. The product obtained from the fermentation of honey and water must is mead, a drink with little common knowledge in Brazil, that suffers from few papers and elaborated technical-scientific researches, resulting in great ignorance about the physical and chemical characteristics of the fermentation, in addition to the absence of more studies on yeasts and characterization of the fermentative profile of them in mead musts. The present work aimed to characterize the behavior of four different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, based on the analysis of the product obtained by alcoholic fermentation of the must, in total acidity, measured in grams of acetic acid per 100 mL, by titration of acid neutralization; in pH, using a digital bench pH meter; in refractometry, analyzing initial and final Brix degree (ºBx), with the use of *Beersmith™* 3 software for the data processing and obtaining the alcohol grade, measured in alcohol by volume. Fermentation was carried out concomitantly in the temperature ranges of 18 ºC and 28 ºC, inoculating the four yeast strains, and analyzing the pre-inoculum wort and the fermentation product. In the temperature range of 18 ºC a lower degree of acidity was obtained, obtaining in average 2,17 $g.L^{-1}$ of acetic acid, being the *Viking Mead* and YT011 strains the ones that reached higher and lower acidity respectively. At 18 ºC were also found the lowest alcoholic strengths, reaching on average 4.66% alcohol by volume, being the *Viking Mead* and YT070 strains the ones that reached higher and lower alcohol degree respectively. Both results are due to the stagnation of the fermentation process, caused by the stress in which the yeast was submitted, probably due to the cytotoxicity of the produced alcohol added to the low fermentation temperature. In the 28 ºC range, the fermentation was complete, generating in average 2,60 $g.L^{-1}$ of acetic acid, being the *Viking Mead* and YT011 strains the ones that reached higher and lower acidity respectively. At 28 ºC the average alcohol strength was 8.77% of alcohol by volume, being the YT011 and YT001 strains the ones that reached higher and lower alcohol degree respectively.

Keywords: acidity; physicochemical analysis; yeast characterization.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Critérios de qualidade e identidade do mel..... 14

Tabela 2 Critérios de qualidade e identidade do hidromel..... 17

Tabela 3 Contagem de células em câmara de Neubauer..... 23

Tabela 4 Medição de pH pré e pós fermentação..... 23

Tabela 5 Medição da refratometria em grau Brix (ºBx) e graduação alcoólica (álcool por volume)..... 24

Tabela 6 Medição da acidez total por titulação em gramas por litro de ácido acético e em miliequivalente por litro..... 24

Sumário

1 Introdução 10

2 Objetivos 12

2.1 Objetivo geral 12

2.2 Objetivos específicos 12

3 Revisão Bibliográfica 13

3.1 Mel 13

3.1.1 Histórico 13

3.1.2 Características físico-químicas 14

3.2 Hidromel 16

3.2.1 Histórico 16

3.2.2 Características físico-químicas 17

4 Materiais e Métodos 19

4.1 Obtenção e cultivo de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* 19

4.1.1 Cultivo 19

4.1.2 Contagem de células totais 19

4.2 Preparo do mosto e fermentação 20

4.3 Análises físico-químicas 20

4.3.1 pH 20

4.3.2 Refratometria 21

4.3.3 Acidez total 21

5 Resultados 23

5.1 Contagem de Células 23

5.1 pH 23

5.2 Refratometria 23

5.3 Acidez total 24

6 Discussão 25

7 Considerações finais e perspectivas futuras 27

8 Referências.....28

1 Introdução

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mel é:

> [...] o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O principal produto proveniente da apicultura é o mel, cuja composição físico-química é de água, levedura, pólen, ácidos orgânicos, substâncias minerais, açúcares monossacarídeos, maltose, sacarose e outros oligossacarídeos (GOIS et al., 2013). As concentrações variam principalmente de acordo com a origem floral do mel, as práticas de apicultura e do clima, podendo conter outras substâncias não citadas (RACOWSKI et al., 2007).

A produção melífera brasileira total, no ano de 2016, foi de 39,6 mil toneladas, com faturamento nacional de 517,7 milhões de reais. Desse montante total, a região Sul do Brasil contribuiu com 17,1 mil toneladas, o equivalente a 43,3% da produção total do país, indicando sua importância perante o mercado brasileiro melífero (IBGE, 2016).

Existem diversas aplicações para o mel, o mesmo sendo utilizado amplamente como aditivo em diversos ramos industriais, como o alimentício, médico, farmacêutico e cosmético. O enfoque na área de alimentos deve-se principalmente a combinação do mel com doces, pães e bebidas alcoólicas (GUEZ et al., 2013). Dentre as bebidas alcoólicas, destaca-se o hidromel, fermentado alcoólico obtido a partir da fermentação do mosto de mel e água, utilizando apenas levedura e sais nutritivos (BRASIL, 2009). Por se tratar de um produto de maior grau de refino e exclusividade, há valorização econômica sobre o mel, sendo uma possibilidade para ampliação da gama de produtos ofertados por apicultores, aumentando sua renda.

Ainda que o mel possua grande importância no mercado brasileiro, o hidromel é um produto de baixa procura e reconhecimento, recentemente havendo um aumento em sua representatividade devido as mídias digitais, aparecendo em filmes e seriados. Por ser uma bebida alcoólica de pouco estudo técnico-científico disponível, quando comparado à cerveja e ao vinho (ROLDÁN et al., 2011). Consequentemente, no Brasil, sua produção é feita de forma empírica, fazendo-se necessário buscar compreender

comportamento de diferentes cepas de levedura em um mosto de hidromel, para que haja maior domínio no seu processo produtivo.

Como forma de agregar conhecimento, o presente trabalho buscou caracterizar o perfil de fermentação de quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, presentes no banco de leveduras da empresa *Yeastech*, uma cepa utilizada para produção de cervejas do tipo ale (YT001) e outra do tipo lager (YT011), uma cepa utilizada para produção de vinhos (YT070) e por fim, uma cepa específica utilizada para produção de hidromel (*Viking Mead*).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho buscou caracterizar o perfil fermentativo de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, analisando o produto obtido por fermentação alcoólica de mostos constituídos por mel e água, por meio de ensaios físico-químicos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o processo de fermentação, utilizando diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em mostos de composição iguais, em duas faixas de temperatura diferentes.
- Analisar o produto obtido, avaliando por fermentação alcoólica, grau Brix, pH e acidez total.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Mel

3.1.1 Histórico

Registros históricos indicam o consumo do mel desde a Idade da Pedra, representado por uma pintura rupestre, localizada na Caverna da Aranha do município de Bicorp, da província de Valência. A arte indica uma figura humana colocando seu braço na cavidade de uma colmeia de abelhas, segurando um cesto em sua outra mão, enquanto as abelhas circundam à sua volta. Esta arte rupestre possui 10.000 anos, sendo ela a evidência mais antiga de humanos em busca do mel. Caçadores-coletores modernos também demonstram grande apreço pelo consumo de mel, no Sri Lanka os Veddas se arriscam na busca de colmeias em fendas das ravinas na região. Na Austrália, aborígenes se alimentam de todo conteúdo das colmeias, mel, cera, larvas e abelhas mortas (ALLSOP; MILLER, 1996).

Dentro das civilizações antigas, no Egito em 2400 A.C. a atividade apícola já era bem definida. Uma escultura encontrada no Templo do Sol de Ne-Woser-Re mostra uma cena apícola, na qual uma figura humana se ajoelha ao lado de colmeias, soprando fumaça, enquanto outras figuras transferiam o mel para jarros. Na Idade do Bronze na Grã-Bretanha (2500 A.C. a 800 A.C.), a cera de abelha era extremamente importante, pela necessidade da mesma na fundição do bronze, e com sua extração o mel vinha junto, sendo utilizado na culinária local. (ALLSOP; MILLER, 1996).

Na Idade Média, o mel era representado em banquetes, utilizado como adoçante para diversos pratos, incluindo sopas, peixes, carnes assadas e vegetais. Entretanto, tais eventos não eram do cotidiano, que na realidade não mostrava grande consumo de mel *per capita*, com ocasionais vendas de colmeias e mel em grande quantidade. Em contraponto, na Inglaterra em 1350 D.C., o mel custava em torno de 2 centavos o litro, sendo o mesmo preço do volume equivalente em manteiga, um produto de consumo comum e barato da época, retificando a abundância do mel nesse período (ALLSOP; MILLER, 1996).

Em todas essas civilizações e povos, o mel assumia mais de uma função, sendo evidenciado em artigos de comércio, como roupas, medalhas e moedas, aparecendo em rituais religiosos e sendo utilizado até mesmo em processos de mumificação e como tratamento medicinal para doenças, além de ser um alimento de alto grau nutritivo (ALLSOP; MILLER, 1996; OLIVEIRA, 2017).

3.1.2 Características físico-químicas

A Instrução Normativa n°11, de 20 de outubro de 2000 do MAPA, define os critérios de qualidade e identidade do mel, por meio da quantidade de açúcares redutores, umidade, sacarose aparente, sólidos insolúveis, minerais, acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural, possuindo parâmetros diferenciados para méis florais que são obtidos do néctar de flores, e méis de melato, os quais são produzidos a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, (BRASIL, 2000). Critérios demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de qualidade e identidade do mel.

Critério	**Mel floral**	**Mel de melato**	**Ambos**
Açúcares redutores ($g.100g^{-1}$)	Mínimo 65	Mínimo 60	-
Umidade ($g.100g^{-1}$)	-	-	Máximo 20
Sacarose aparente ($g.100g^{-1}$)	Máximo 6	Máximo 15	-
Sólidos insolúveis ($g.100g^{-1}$)	-	-	Máximo 0,1 (0,5 se for mel prensado)
Minerais ($g.100g^{-1}$)	Máximo 0,6	Máximo 1,2	-
Acidez ($mEq.kg^{-1}$)	-	-	Máximo 50
Atividade diastásica (escala Gothe)	-	-	Mínimo 8 (3 se HMF inferior a $15mg.^{kg-1}$)
Hidroximetilfurfural ($mg.kg^{-1}$)	-	-	Máximo 60

Fonte: Adaptado de Brasil, 2000.

O mel é tido como um fluido viscoso de alto teor de açúcares, produzido por abelhas a partir do néctar ou exsudato de plantas, o qual sofre diferenças em sua composição e qualidade baseadas na localidade, umidade, origem floral, solo, tempo e estado de maturação, entre outros (ALVES et al, 2005; FINCO; MOURA; SILVA; 2010). O mesmo é formado quando o néctar ou exsudato passa por um processo de evaporação pelos insetos, os quais adicionam enzimas presentes em suas glândulas salivares, sendo a invertase (β-frutofuranosidase) a principal, cuja função é converter sacarose em frutose e glicose, os dois açúcares em maior percentual no mel. Esse

processo de evaporação traz dois grandes benefícios: a diminuição do espaço requerido para armazenagem do mel e a grande concentração de açúcares na mistura, resultando numa osmolaridade grande o suficiente para inibir atividade microbiana por meio de desidratação osmótica, com a exceção de esporos bacterianos e organismos resistentes a esse tipo de condição. Quando a solução atinge o percentual correto de umidade, variando entre 13,4% a 26,6% dependente de diversos fatores, ela é depositada em favos e selada com cera, para que ocorra maturação. (CRANE et al., 1991; MANDAL, D.; MANDAL, S., 2011).

A respeito da acidez, os ácidos presentes no mel são formados a partir da enzima glicose-oxidase, da família das oxidoredutases agindo sobre a dextrose, resultando na formação de gluconolactona e peróxido de hidrogênio. Também são encontrados outros ácidos, em menor quantidade, como o ácido butírico, fórmico, acético, benzoico, citírico, iso-valérico, lático, maleico, oxálico, fenilacético, propiônico, piroglutânico, succínico e valérico (OLIVERA, 2017). A gluconolactona é hidrolisada em ácido glucônico, o composto acidificante em maior percentual no mel, o qual é responsável pela faixa de pH de 3,2 e 5,5, sendo este intervalo o suficiente para inibir o crescimento de diversas cepas bacterianas, como *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. Mesmo dentro desses critérios, organismos como bolores e leveduras possuem tolerância contra tais condições adversas, e o desenvolvimento dos mesmos no mel pode acarretar na diminuição do grau de açúcares e o aumento da acidez (MOLAN, 1992; FINCO; MOURA; SILVA, 2010; OLIVEIRA, 2017). O peróxido de hidrogênio também é associado a funções antimicrobianas, baseado na sua concentração no mel (MANDAL, D.; MANDAL, S., 2011).

Os carboidratos são as substâncias em maior quantidade no mel, concedendo características como viscosidade, higroscopicidade, granulação, e valor energético. Os açúcares mais presentes são a glicose, frutose, sacarose e maltose, existindo outros oligossacarídeos em menor percentual. Os açúcares redutores (frutose e glicose) são encontrados em maior percentual, em torno de 75% a 95%, sendo que a glicose, por conta de sua baixa solubilidade, determina a tendência de cristalização do mel, enquanto a frutose, pela sua alta higroscopicidade, determina o dulçor. A proporção de glicose:frutose não é exata, por depender de diversos fatores, sendo o principal a origem floral do mel, mas é geralmente de 1:2 (SATO; MIYATA, 2000; SODRÉ, 2005; OLIVEIRA, 2017).

3.2 Hidromel

De acordo com o MAPA, “hidromel é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável” (BRASIL, 2009).

Mesmo a produção melífera possuindo um impacto econômico significativo em diversos países, com inúmeros trabalhos científicos produzidos na área, existem poucos estudos acerca de produtos derivados do mel, como o hidromel (ROLDÁN et al., 2011), ainda são poucos, principalmente no Brasil.

3.2.1 Histórico

O hidromel é uma bebida reconhecida como uma das mais antigas consumidas pelo homem, pela simplicidade da forma de produzir e por insumos de fácil acesso. Na China, na região de Henan, em um assentamento neolítico denominado Jiahu foram encontrados vasos de 7000 A.C., que por meio de técnicas de cromatografia e espectroscopia, identificaram amostras de arroz, mel e frutas (MCGOVERN et al., 2004), sendo esta uma das primeiras iterações da produção de hidromel.

Em termos da bebida alcoólica mais antiga do mundo consumida, o vinho, o hidromel e a cerveja ainda competem entre si. Com evidências do início da horticultura (9500 A.C. a 8000 A.C.) e da viticultura (8000 B.C. a 5000 B.C.), todo esse período pode ter sido propício para as primeiras produções da cerveja e do vinho. Entretanto, não existem grandes pesquisas no campo arqueológico acerca do hidromel, dificultando datar a origem do hidromel (VIDRIH; HRIBAR, 2016). Na Europa do Norte o consumo de hidromel foi bastante popular até o vinho ser importado a baixo custo para essa região (PEREIRA, 2008). Atualmente, o hidromel tem novamente ganhado espaço no mercado nacional e internacional, principalmente devido as populares referências cinematográficas como em *Senhor dos Anéis*, *O Thor* e *Game of Thrones*, nos quais a bebida é tratada com reverência, sendo amplamente consumida. A bebida também foi responsável pela origem do termo “Lua de mel”, onde os recém-casados deveriam beber hidromel durante a primeira lua cheia ou a mais próxima do casamento pois a bebida supostamente possuía propriedades afrodisíacas (VIDRIH; HRIBAR, 2016).

3.2.2 Características físico-químicas

A instrução normativa Nº 34, de 29 de novembro de 2012 do MAPA, define os critérios de identidade e qualidade de diversas bebidas fermentadas, incluindo o hidromel. Os critérios são: acidez fixa, acidez total, acidez volátil, anidrido sulfuroso total, cinzas, cloretos totais, extrato seco reduzido, graduação alcoólica em % v/v à 20 ºC e teor de açúcar. Critérios demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Critérios de qualidade e identidade do hidromel.

Critérios	**Limite mínimo**	**Limite máximo**	**Classificação**
Acidez fixa ($MEq.L^{-1}$)	30	---	---
Acidez total ($MEq.L^{-1}$)	50	130	---
Acidez volátil ($MEq.L^{-1}$)	---	20	---
Anidrido sulfuroso total ($g.L^{-1}$)	---	0,35	---
Cinzas ($g.L^{-1}$)	1,5	---	---
Cloretos totais ($g.L^{-1}$)	---	0,5	---
Extrato seco reduzido ($g.L^{-1}$)	7	---	---
Gradação alcoólica (%v/v a 20 ºC)	4	14	---
Teor de açúcar ($g.L^{-1}$)	---	≤ 3	Seco
	>3	---	Suave

Fonte: Adaptado de Brasil, 2012.

A fermentação alcoólica é uma forma de leveduras biotransformar moléculas de glicose em etanol e CO_2. O processo se dá na conversão de glicose em piruvato, em uma reação de descarboxilação catalisada pela piruvato-descarboxilase, resultando em CO_2 e acetaldeído, o qual é reduzido em etanol e NADH pela enzima álcool-desidrogenase. A razão da reação é de 1:2, ou seja, para cada molécula de glicose, há a saída de duas moléculas de etanol e CO_2 (NELSON; COX, 2014). O gás carbônico produzido é responsável pela efervescência característica de algumas bebidas alcoólicas, como a cerveja e o champagne, existindo métodos mais modernos

e eficientes, como a de injeção de gás CO_2 diretamente no produto fermentado para sua carbonatação (DESCOINS et al., 2006).

Por conta do alto teor de açúcar envolvido na produção de hidromel, e a baixa quantidade de nitrogênio disponível no mel, a fermentação tende a ser devagar, necessitando de ajustes no pH, temperatura e nutrientes, para que sejam encontradas faixas de operação fermentativa em condições ótimas (RAMALHOSA et al., 2011). Outros pontos que afetam o processo de fabricação é a falta de homogeneidade do mel, o mesmo possuindo características físico-químicas variáveis, possuindo diferenças entre períodos diferentes do ano em uma mesma região; a ausência de leveduras específicas para a fermentação do mel, sendo utilizadas cepas adaptadas a mostos de vinho e cerveja, os quais possuem índices de pH, açúcares, macronutrientes e micronutrientes diferentes dos presentes no mel (WELKE et al., 2008; RAMALHOSA et al., 2011); e por fim, os fatores de inibição de crescimento microbiano presente no mel, somada a carência de pesquisas na área de caracterização de leveduras em mostos de hidromel, resultam na dificuldade de estabelecer um padrão do processo fermentativo. Para combater tais problemas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de méis já foram estudadas como substitutos para leveduras comerciais, por apresentarem melhor osmotolerância, por conta da grande quantidade inicial de açúcares presente no mosto, e maior adaptação ao tipo de mosto (PEREIRA, et al., 2009).

O uso de nutrientes de nitrogênio assimilável por leveduras, como saís de amônia é de considerável benefício ao processo fermentativo, principalmente em mostos com baixa percentual de nitrogênio disponível, situação comum em hidroméis (VIDRIH; HRIBAR, 2016). A adição de pólen na confecção do hidromel, diminui as taxas de acidez totais, aumenta as taxas de fermentação, que resultam em uma concentração de álcool atingida superior às amostras não tratadas com pólen, além de um maior grau de aceitação no perfil sensorial do hidromel, servindo como uma possível alternativa para o aumento de estabilidade e palatabilidade da bebida (ROLDÁN et al., 2011).

4 Materiais e Métodos

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia, do Centro de Desenvolvimento Técnológico, da Universidade Federal de Pelotas, sob supervisão do professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, com o apoio do *MSc*. Renan Eugênio Araujo Piraine e a colaboração da empresa *Yeastech*.

Os ensaios realizados, bem como os materiais utilizados, para a execução do presente trabalho serão descritos abaixo. Todas as avaliações dispuseram de no mínimo duas repetições.

4.1 Obtenção e cultivo de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, denominadas YT001, YT011, YT070 e *Viking Mead*, as quais foram cedidas pela empresa de biotecnologia *Yeastech*, em meio de cultivo sólido.

4.1.1 Cultivo

Em uma cabine de fluxo laminar, foi realizada uma semeadura em placas de petri retirando uma colônia de cada cepa do material fornecido pela empresa, por intermédio de esgotamento, em placas (4) contendo o meio de cultivo sólido YM de seguinte composição: 0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona bacteriológica, 1% dextrose e 2% ágar.

Foi inoculada uma colônia de cada placa, em Erlenmeyers (15 minutos à 121 ºC) contendo o meio 20 mL de cultivo YM. Foram mantidos durante 24 horas em agitação e temperatura constantes de 180 rpm e 28 ºC respectivamente, em agitador orbital. Foi feita a expansão do cultivo, vertendo os 20 mL de cada frasco em frascos contendo mais 80 mL de meio de cultivo YM, repetindo as mesmas condições de cultivo. Por fim, foi realizada mais uma expansão de cultivo, vertendo os 80 mL de cada frasco em frascos contendo mais 900 mL de meio de cultivo YM, totalizando 1 L de meio. Foram executadas colorações de Gram entre cada processo de expansão, não identificando contaminações. Os cultivos foram armazenados em câmara fria a 4 ºC, para serem utilizados posteriormente.

4.1.2 Contagem de células totais

Após o processo de cultivo, foram realizadas contagens de células totais por câmara de Neubauer, realizando a diluição seriada de cada cultivo até a proporção de

1:1000, utilizando a seguinte fórmula para o número de células por mL (ABSHER,1973):

$$\textbf{nº de células/mL} = \frac{\textbf{nº total de células}}{\textbf{nº de quadrantes contados}} \textbf{ x fator de diluição x 10.000}$$

Foram retiradas alíquotas de cada meio em sextuplicata, para padronizar o número de células em $5x10^9$ células/mL. As amostras foram centrifugadas à 5000g por 10 minutos e ressuspendidas em 10 mL utilizando PBS 1x, totalizando no número desejado de células por mL.

4.2 Preparo do mosto e fermentação

Na elaboração do mosto foram utilizados água, filtrada com filtro de carvão ativado, e mel, de coloração âmbar claro, correspondente a 59 mm na escala PFund, ambos homogeneizados à 40 ºC em um caldeirão de inox, tirando amostras para a medição do grau Brix, por meio de um refratômetro analógico. Quando atingido 15,21ºBx, o mosto foi dividido em 24 Erlenmeyers de 500 mL, ocupando o volume total, restando apenas o *headspace* dos frascos que posteriormente foram esterilizados por autoclavagem (15 minutos à 121 ºC). Após resfriados até a temperatura ambiente, os Erlenmeyers foram inoculados em triplicata com cada uma das cepas (YT001, YT011, YT070 e *Viking Mead*), e colocados em 2 unidades de refrigeração/aquecimento mantidas nas temperaturas 18 ºC e 28 ºC, dispostos em triplicata em cada, totalizando 12 Erlenmeyers por unidade. Após o período de de 24 dias de fermentação (576 horas), foram tiradas alíquotas dos Erlenmeyers para análises físico-químicas, centrifugando-as a 5000g por 10 minutos (centrífuga Kubota), descartando o *pellet* de células formado e mantendo o sobrenadante, armazenando em câmara fria à 4 ºC.

4.3 Análises físico-químicas

4.3.1 pH

As alíquotas foram submetidas a um pHmetro de bancada digital (Kasvi), calibrado previamente, analisando o mosto pré-fermentação e pós-fermentação, em duplicata.

4.3.2 Refratometria

Foi utilizado um refratômetro analógico (Akso), calibrado previamente, utilizando as amostras alíquotadas de antemão. Na leitura obteve-se os dados do grau Brix inicial e final, submetendo ambos no programa *Beersmith*^{TM} 3, para a correção do grau final, por conta da presença do álcool. O mesmo *software* também foi utilizado para calcular o teor alcoólico, em álcool por volume, da bebida fermentada.

4.3.3 Acidez total

A metodologia para a obtenção da acidez total baseia-se na titulação de neutralização de ácidos, por meio de uma solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH), com a utilização do indicador fenolftaleína ou com pHmetro até o ponto de equivalência, pH 8,2 – 8,4 (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2005).

Foram transferidos 50 mL de cada amostra do fermentado, centrifugado por 10 minutos em 5000g, utilizando uma pipeta volumétrica de 50 mL, o qual foi adicionado de 0,5 mL de indicador fenolftaleína, em seguida sendo titulado com a solução de hidróxido de sódio padronizada (0,05 M) até que a coloração rósea fosse atingida. A acidez total é expressa em gramas de ácido acético por litro de amostra, de acordo com a seguinte fórmula (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2005):

$$\frac{n \times M \times f \times PM}{100 \times V} = \text{ácidos totais, em gramas de ácido acético por litro de amostra}$$

n = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL.
M = molaridade da solução de hidróxido de sódio.
f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio.
PM = peso molecular do ácido acético (60g).
V = volume tomado da amostra, em mL.

Para o preparo da solução de hidróxido de sódio (NaOH), a mesma foi padronizada utilizando o biftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$) como padrão primário. Considerando que a massa molar do hidróxido sódio é de 40 g/mol, foram pesados 2 gramas em uma balança de precisão, para se obter a molaridade de 0,05 M. As macros perolas foram dissolvidas em água destilada, com o auxílio de um bastão de vidro e um béquer. A solução foi transferida para um balão de 1 L e completada com

água destilada até o menisco, fechando o balão e homogeneizando-o. Como a reação entre NaOH e $C_8H_5KO_4$ é na proporção de 1:1, ou seja, 1 mol de NaOH reage com 1 mol de $C_8H_5KO_4$, foram pesados 0,2555 e 0,2551 gramas de biftalato de potássio, de massa molar 204,22 g/mol, para reagir com 25 mL da solução de hidróxido de sódio, em duplicata. O $C_8H_5KO_4$ foi dissolvido em 25 mL de água destilada e adicionado 0,5 mL de fenolftaleína, sendo posteriormente titulado. O cálculo da concentração de NaOH foi realizado da seguinte forma:

$$\mathbf{C = \frac{m}{MM \times v}}$$

C = concentração.
m = massa em gramas.
MM = massa molar.
v = volume gasto na titulação.

A média de concentração das duplicatas foi de 0,433 $mol.L^{-1}$, sendo esse valor utilizado na fórmula do fator de correção (f):

$$\mathbf{f = \frac{concentração\ real}{concentração\ teórica}}$$

O fator de correção obtido foi de 0,866, sendo esse inserido na fórmula de cálculo para a acidez total. Após o término da solução padrão de NaOH (F_C 0,866), foi necessário executar o protocolo de padronização novamente, obtendo-se um fator de correção 0,944.

5 Resultados

5.1 Contagem de Células

Tabela 3: Contagem em câmara de Neubauer.

Cepas	Nº de células/mL	Nº de células totais
YT001	$73,75 \times 10^6$	$73,75 \times 10^9$
YT011	$76,5 \times 10^6$	$76,5 \times 10^9$
YT070	261×10^6	261×10^9
Viking Mead	$233,75 \times 10^6$	$233,75 \times 10^9$

Por conta de as células terem sido contadas logo após o cultivo, representam com grande eficácia a viabilidade também.

5.1 pH

O resultado da medição de pH do mosto pré e pós inoculação, por pHmetro de bancada digital (Kasvi), está representado na Tabela 4.

Tabela 4: Medição de pH pré e pós fermentação.

Cepas	pH	
	Fermentado à 18 ºC	Fermentado à 28 ºC
YT001	3,37	3,27
YT011	3,62	3,51
YT070	3,58	3,36
Viking Mead	3,35	3,26
Mosto pré-inóculo	4,01	

5.2 Refratometria

O resultado da análise de refratometria, por refratômetro analógico (Akso), da medição do mosto pré e pós inóculo, em grau Brix, e da graduação alcoólica, definida em álcool por volume, tratados no *software Beersmith*™ 3, está representado na Tabela 5.

Tabela 5: Medição da refratometria em grau Brix (ºBx) e graduação alcoólica (álcool por volume).

Cepas	**Grau Brix (ºBx)**		**Álcool por volume (%)**	
	Fermentado à 18 ºC	**Fermentado à 28 ºC**	**Fermentado à 18 ºC**	**Fermentado à 28 ºC**
YT001	10,21	5,46	4,67	8,61
YT011	10,26	5,06	4,63	8,93
YT070	10,38	5,22	4,53	8,80
Viking Mead	10,02	5,28	4,83	8,75
Mosto pré-inóculo	15,21		0	

5.3 Acidez total

Resultados da análise de acidez total, por meio de titulação de hidróxido de sódio, transcritos na Tabela 6.

Tabela 6: Medição da acidez total por titulação em gramas por litro de ácido acético e em miliequivalente por litro.

Cepas	**Acidez total ($g.L^{-1}$ de ácido acético)**		**Acidez total ($MEq.L^{-1}$)**	
	Fermentado à 18 ºC	**Fermentado à 28 ºC**	**Fermentado à 18 ºC**	**Fermentado à 28 ºC**
YT001	2,10	2,66	35,00	44,33
YT011	1,88	2,03	31,30	33,83
YT070	2,14	2,84	35,60	47,33
Viking Mead	2,59	2,89	43,16	48,16
Mosto pré-inóculo	0,41		6,83	

6 Discussão

No processo de elaboração do mosto, a utilização de um método de esterilização se torna necessário, visto que os microorganismos presentes no mel tornam possíveis a sua fermentação por conta da redução da pressão osmótica, causada pela grande concentração de açúcares presentes, e do aumento do teor de umidade, ambos influenciados pela adição de água para a dissolução e diluição do mel (ASHENAFI, 2002; RAMALHOSA et al., 2011). O uso de tratamentos de calor, como pasteurização, fervura e autoclavagem provaram-se eficientes como métodos de esterilização do mosto de mel, existindo também o uso de químicos, como metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) e metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) (MENDES-FERREIRA et al., 1992; ROLDÁN et al., 2011). Os métodos de esterilização por calor também promovem a desnaturação do conteúdo proteico presente no mosto, promovendo uma clarificação mais rápida e eficiente da bebida, sendo utilizada da autoclavagem no presente trabalho, para que não houvesse interferência microbiológica no momento em que as cepas de levedura fossem inoculadas no mosto. Importante ressaltar que todas que cada fermentação em triplica foram tratadas como iguais, resultando em apenas uma amostra por cepa por faixa de temperatura.

O número de células inoculadas baseou-se em estudos anteriores, os quais concluíram que $5x10^9$ células/mL de mosto, semelhantes a quantidade utilizada por Bely (2008), Gomes (2010) e Mileski (2016), são suficientes para hidroméis de até 18ºBx, iniciando uma fermentação vigorosa.

As temperaturas de fermentação de hidromel 18 ºC e 28 ºC foram selecionadas por terem uma diferença significativa entre si, mas ainda estarem dentro da faixa de fermentação alcoólica da levedura, a qual é recomendada estar entre 10 ºC e 40 ºC para a fermentação de hidromel (RAMALHOSA et al, 2011; NAVRÁTIL; ŠTURDÍK; GEMEINER, 2001; GOMES, 2010). A temperatura de fermentação está diretamente relacionada à velocidade das reações metabólicas, na qual altas temperaturas resultam em maiores taxas de conversão de glicose em etanol, até 30 ºC, com aumento da mortalidade das células, ocorrendo o inverso em temperaturas mais baixas (NAGODAWITHANA; CASTELLANO; STEINKRAUS, 1974; ABDEL-BANAT, 2010). Foi observado no experimento uma produção superior de etanol na temperatura de 28 ºC em todas as cepas, com pequenas diferenças entre cada estirpe, e o inverso ocorrendo na temperatura de 18 ºC, onde ocorreu a estagnação

da fermentação, por conta de fatores como frio e toxicidade do álcool, atingindo em cerca da metade dos valores de álcool por volume, sendo interessante ressaltar que ao subir a temperatura, houve aumento de atividade microbiológica, visualizado pela formação de espuma e bolhas nos frascos. A atenuação variou em torno de 50% para 95%, à 18 ºC e 28 ºC respectivamente, indicando maior grau de conversão de açúcares na temperatura de 28 ºC. Ambos os resultados de temperatura estão dentro do padrão de graduação alcoólica preconizado pelo MAPA, encontrado na Tabela 2.

Os valores de acidez também parecem estar relacionados à temperatura, nas quais as taxas mais elevadas se encontraram nas amostras que fermentaram a 28 ºC. Tanto as amostras de 18 ºC quanto as de 28 ºC, possuíram valores significativamente maiores que os encontrados por Gomes (2010) e menores que os encontrados por Mileski (2016). Interessante ressaltar que nenhum dos valores atingiu o mínimo requerido definido pelo MAPA (Tabela 2), sendo necessário haver a alteração de alguns fatores para que a acidez final seja maior, como: aumento a concentração do mel presente no mosto, por este ser responsável em grande parte pela acidez pré-fermentação; genética da levedura, utilizando cepas com maior tolerância e produção de ácidos; e por fim, a temperatura de fermentação está ligada diretamente com a velocidade do metabolismo e sensibilidade a ácidos como fator de estresse (PALMQVIST et al., 1999).

7 Considerações finais e perspectivas futuras

Entre as cepas estudadas, comparando-as a uma mesma faixa de temperatura, não houveram diferenças apreciáveis, entre os valores de acidez total, pH e refratometria. No entanto, ao compararmos entre as diferentes faixas de temperatura, fica clara a diferença que a mesma causa no processo fermentativo, em 28 ºC foi possível realizar a fermentação na quase totalidade de açúcares redutores, por conta das medições entre a refratometria inicial e final, o que significa um grande grau de atenuação, além de valores de pH e acidez inferiores aos encontrados nos fermentados em 18 ºC.

O hidromel pode ser uma forma de aumentar a renda de apicultores, por se tratar de uma bebida de fabricação simples e pouco dispendiosa quando comparada a outros processos fermentativos, trazendo à tona uma gama de produtos únicos e de potencial mercadológico ainda não explorado. Entretanto, para que seja possível esse tipo de empreendimento, são necessárias pesquisas nas áreas de caracterização de leveduras e fermentação do hidromel, para tornar o processo mais rápido, eficiente e lucrativo.

Os resultados aqui presentes, abrem a possibilidade de investigações mais incisas, testando não apenas o produto obtido por fermentação, mas também a matéria prima utilizada no preparo do mosto, somando análises extras como acidez volátil, acidez fixa, açúcares redutores, sólidos solúveis, sólidos insolúveis, entre outras diversas possibilidades, e por fim, uma análise sensorial, qualificando os diferentes produtos obtidos por fermentação.

8 Referências

ABDEL-BANAT, Babiker MA et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.

ABSHER, Marlene. Hemocytometer counting. **Tissue Culture**. 1973. p. 395-397.

ASHENAFI, Mogessie. The microbiology of Ethiopian foods and beverages: A review. **Ethiopian Journal of Science**, v. 25, n. 1, p. 97-140, 2002.

ALLSOP, Karen A.; MILLER, Janette Brand. Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. **British Journal of Nutrition**, v. 75, n. 4, p. 513-520, 1996.

ALVES, Rogério Marcos de Oliveira et al. Características físico-químicas de amostras de mel de Melipona mandacaia Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 25, n. 4, p. 644-650, dez. 2005.

BELY, Marina et al. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 312-320, 2008.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da União, 23 de outubro de 2000, Seção I, págs. 16-17.

BRASIL. **Decreto Nº6.871 de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, 5 de junho de 2009, Seção I, pág. 20.

DESCOINS, Charles et al. Carbonation monitoring of beverage in a laboratory scale unit with on-line measurement of dissolved CO2. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 541-553, 2006.

CRANE, Eva. Honey from honeybees and other insects. **Ethology, Ecology & Evolution**, v. 3, n. sup1, p. 100-105, 1991.

ESTEVINHO, Letícia et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.

FINCO, Fernanda Dias Bartolomeu Abadio; MOURA, Luciana Learte; SILVA, Igor Galvão. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p.706-712, 2010.

GOMES, Teresa. **Produção de hidromel: efeito das condições de fermentação**. 74f. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. 2010.

GOIS, Glayciane Costa et al. Composição do mel de Apis mellifera: Requisitos de qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 137-147, 2013.

GUEZ, Marcelo Andrés Umsza et al. Estudo prospectivo de produtos derivados do mel associado ao álcool e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 2, p. 115, 2014.

HENDERSON, Julian et al. **Ancient Egyptian materials and technology**. Cambridge University Press, 2000.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 5 de outubro de 2018.

MANDAL, Manisha Deb; MANDAL, Shyamapada. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 1,2, p. 154-169, abr. 2011.

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

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

MILESKI, João Paulo Fernando. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras Saccharomyces**. 87f. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

MOLAN, Peter C. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee world**, v. 73, n. 1, p. 5-28, 1992.

NAGODAWITHANA, Tilak W.; CASTELLANO, Carmine; STEINKRAUS, Keith H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of Saccharomyces cerevisiae in rapid fermentations. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 383-391, 1974.

NAVRÁTIL, Marián; ŠTURDÍK, Ernest; GEMEINER, Peter. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 12, p. 977-982, 2001.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, ed. 6, p.565, 2014.

OLIVEIRA, Fernanda Moreira. **Perfil físico-químico e de qualidade de méis de mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul (Brasil**). 70f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial. 2017.

PALMQVIST, Eva et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.

PEREIRA, Ana Paula et al. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2057-2063, 2009.

PEREIRA, Ana Paula. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel**. Tese de Doutorado. 81f. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, 2008.

RACOWSKI, Ilana. et al. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**. v. 30, p. 106-115, 2007.

RAMALHOSA, Elsa et al**.** Mead production: Tradition versus modernity. **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, p. 101-118, 2011.

ROLDÁN, A. et al. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 574-582, 2011.

SODRÉ, Geni da Silva. **Características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos estados do Ceará e Piauí**. 140f. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

SATO, Tomoi; MIYATA, Go. The nutraceutical benefit, part iii: honey. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, California)**, v. 16, n. 6, p. 468-469, 2000.

VIDRIH, Rajko; HRIBAR, Janez. Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. **Traditional Foods**. Springer, Boston, MA, p. 325-338, 2016.

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

WAHDAN, H. A. L. Causes of the antimicrobial activity of honey. **Infection**, v. 26, n. 1, p. 26-31, 1998.

WELKE, Juliane Elisa et al. **Caracterização físico-química de méis de Apis mellifera L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul**. Ciência Rural, v. 38, n. 6, p.1737-1741, 2008.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 4.ed., p. 421-422, 2005.