

**MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: UM SUBSTRATO
SUSTENTÁVEL PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS**

Delcy Tavares Soares

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de
Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e
Segurança Alimentar*

Orientada por:

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Doutora Vanessa Marina Branco Paula

Bragança
2025

AGRADECIMENTOS

Em agradecimento, expresso a minha mais profunda gratidão à minha orientadora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho, cuja dedicação, paciência e sabedoria foram fundamentais em cada etapa desta jornada. Agradeço não apenas pela orientação científica, mas também pelo apoio humano, pela compreensão nos momentos de incerteza e pela confiança depositada no meu trabalho.

À minha coorientadora Doutora Vanessa Marina Branco Paula, agradeço sinceramente por toda a atenção, disponibilidade e incentivo constantes. As suas observações criteriosas e o olhar atento sobre cada detalhe foram essenciais para o amadurecimento deste estudo. Em especial, agradeço pela amizade, pelas palavras de ânimo e pela presença firme e inspiradora em todos os momentos em que mais precisei e sua exigência e sensibilidade ajudaram-me a crescer como investigador e como pessoa, ensinando-me que a ciência se faz com rigor, mas também com coração.

Aos meus amigos e familiares, que estiveram sempre por perto, mesmo quando o caminho parecia longo e difícil, o meu mais sincero obrigado. Pelas conversas que aliviaram o cansaço, pelas risadas nos dias tensos e por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidava. Cada gesto, palavra e companhia foi combustível para que eu seguisse em frente.

Aos colegas e funcionários do laboratório de microbiologia do IPB, deixo o meu profundo reconhecimento. O apoio prático, a troca de conhecimento e o espírito de equipa tornaram este trabalho não apenas possível, mas também prazeroso. Cada ajuda, por menor que parecesse, teve um impacto enorme no resultado.

Um agradecimento especial à aluna de mobilidade Ludmila Lopes, cuja colaboração foi indispensável. A sua energia, amizade e dedicação fizeram toda a diferença, tornando o ambiente de trabalho mais leve e produtivo.

Cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho e cada partilha fizeram parte deste percurso. Hoje, ao olhar para trás, vejo que esta tese não é apenas o resultado de um trabalho científico, mas a soma de todas as pessoas que caminharam comigo, acreditaram em mim e fizeram deste sonho uma realidade. Com todo o meu coração, obrigado por tudo.

RESUMO

O hidromel é uma das bebidas fermentadas mais antigas, produzida tradicionalmente a partir da fermentação alcoólica de uma solução de mel e água. No entanto, o elevado custo do mel e a sua variabilidade sazonal constituem entraves à sua produção em escala industrial. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo para a produção de hidromel, analisando o impacto da sua incorporação, parcial ou total, na cinética fermentativa e composição físico-química.

Foram preparadas formulações com diferentes proporções de melaço (0%, 50% e 100%), mantendo-se constantes os parâmetros de fermentação (pH, densidade inicial, temperatura e levedura inoculada). Monitorizaram-se variáveis como o consumo de açúcares redutores, produção de etanol, viabilidade celular e tempo de fermentação. Após o processo fermentativo, os hidroméis foram analisados quanto ao teor alcoólico, acidez, açúcares residuais, glicerol e dióxido de enxofre total.

Os resultados revelaram que a substituição parcial do mel até 50% por melaço não comprometeu a fermentação nem a qualidade final da bebida, mantendo-se teores alcoólicos entre 10,3% e 10,8% (v/v), com elevada eficiência fermentativa e bom equilíbrio sensorial. A formulação com 50% de melaço destacou-se pelo maior rendimento alcoólico (90,2%) e composição estável. Por outro lado, a substituição total resultou numa fermentação mais lenta, com menor teor alcoólico (9,35% v/v) e acidez mais elevada, embora compatível com a fermentação controlada.

Conclui-se que o melaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como substituto parcial do mel na produção de bebidas fermentadas, representando uma estratégia tecnológica viável, economicamente acessível e ambientalmente sustentável, com potencial para diversificar a oferta de bebidas fermentadas e valorizar subprodutos agroindustriais.

Palavras-chave: Hidromel, melaço de cana-de-açúcar, mel, substrato alternativo, bebidas fermentadas.

ABSTRACT

Mead is one of the oldest fermented beverages, traditionally produced from the alcoholic fermentation of a solution of honey and water. However, the high cost of honey and its seasonal variability constitute obstacles to its production on an industrial scale. In this context, the present work aimed to evaluate the potential of sugarcane molasses as an alternative substrate for mead production, analyzing the impact of its partial or total incorporation on the fermentative kinetics and physicochemical composition.

Formulations with different proportions of molasses (0%, 50%, and 100%) were prepared, keeping the fermentation parameters constant (pH, initial density, temperature and inoculated yeast). Variables such as reducing sugar consumption, ethanol production, cell viability and fermentation time were monitored. After the fermentation process, the meads were analyzed for alcohol content, acidity, residual sugars, glycerol and total sulfur dioxide.

The results revealed that the partial replacement of honey up to 50% with molasses did not compromise fermentation or the final quality of the beverage, maintaining alcohol levels between 10.3% and 10.8% (v/v), with high fermentative efficiency and good sensory balance. The formulation with 50% molasses stood out for its higher alcohol yield (90.2%) and stable composition. On the other hand, total replacement resulted in slower fermentation, with lower alcohol content (9.35% v/v) and higher acidity, although compatible with controlled fermentation.

It is concluded that sugarcane molasses can be used as a partial substitute for honey in the production of fermented beverages, representing a viable, economically accessible and environmentally sustainable technological strategy, with the potential to diversify the supply of fermented beverages and add value to agro-industrial by-products.

Keywords: Mead, sugarcane molasses, honey, alternative substrate, fermented beverages.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
CAPÍTULO I Introdução	1
1. ENQUADRAMENTO GERAL	2
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo geral	4
1.1.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II Fundamentação teórica	5
2. MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	6
2.1. Definição e origem como subproduto da produção de açúcar.....	6
2.2. Composição e propriedades físico-químicos	7
2.3. Uso industrial e potencial fermentativo	8
3. HIDROMEL	10
3.1. Definição.....	10
3.2. História e Produção.....	10
3.3. Classificação do Hidromel.....	10
3.4. Processo de produção	12
3.5. Teor alcoólico e leveduras	14
CAPÍTULO III Metodologia	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Amostras de mel e melaço de cana-de-açúcar	16
4.2. Caracterização físico-química do mel e do melaço de cana-de-açúcar	16
4.2.1. pH	16
4.2.2. Acidez livre.....	17
4.2.3. Condutividade elétrica.....	17

4.2.4. Humidade	17
4.2.5. Cinzas totais.....	17
4.2.6. Perfil mineral	18
4.2.7. Atividade da água (aw)	18
4.2.8. Teor de açúcares	19
4.3. Análise do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante	19
4.3.1. Extração dos compostos fenólicos.....	19
4.3.2. Determinação de compostos fenólicos totais.....	20
4.3.3. Determinação de flavonoides totais.....	21
4.3.4. Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP.....	21
4.3.5. Redução do radical livre DPPH.....	22
4.4. Análises microbiológicas.....	22
4.4.1. Determinação quantitativa de Bacillus cereus.....	22
4.4.2. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas totais.....	23
4.4.3. Quantificação de fungos filamentosos e leveduras.....	23
4.4.4. Detecção e quantificação de coliformes totais e Escherichia coli.....	23
4.5. Procedimento técnico e experimental para a produção das bebidas fermentadas	
24	
4.5.1. Preparação dos mostos	24
4.5.2. Hidratação da levedura	25
4.5.3. Condições e monitorização da fermentação	26
4.5.4. Caracterização físico-química e microbiológica do mosto e do produto final	
26	
4.5.5. pH.....	27
4.5.6. Teor de açúcares solúveis (em °brix).....	27
4.5.7. Acidez total.....	27
4.5.8. Azoto assimilável	27
4.5.9. Biomassa celular.....	28
4.5.10. Viabilidade celular.....	28
4.5.11. Açúcares redutores	29
4.5.12. Acidez volátil.....	29
4.5.13. Teor alcoólico (% v/v).....	29
4.5.14. Dióxido de enxofre total (SO ₂).....	30
4.5.15. Rendimento da fermentação	30
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
CAPÍTULO IV Resultados e Discussão	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Caracterização físico-química do mel e do melaço de cana-de-açúcar	33
5.1.1. pH, acidez livre e condutividade elétrica.....	33
5.1.2. Humidade e cinzas totais	35
5.1.3. Perfil mineral	37
5.1.4. Atividade da água	40
5.1.5. Teor de açúcares	41

5.2. Análise do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante	43
5.3. Análises microbiológicas.....	44
5.4. Caracterização físico-química e microbiológica do mosto e do produto final ...	47
5.4.1. Análise da cinética de crescimento microbiano durante a fermentação	47
5.4.2. Azoto assimilável	50
5.4.3. Açúcares redutores	53
5.4.4. Acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total (SO ₂)	55
5.4.5. Teor alcoólico (% v/v) e rendimento da fermentação	58
CAPÍTULO V Considerações finais	60
6. CONCLUSÃO.....	61
7. PERSPETIVAS FUTURAS.....	63
CAPÍTULO VI Referências bibliográficas	65
8. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de produção de açúcar e subprodutos.....	6
Figura 2: Aplicação industrial do melaço.	9
Figura 3: Hidromel Polonês.....	10
Figura 4: Matéria-prima (mel multifloral e melaço de cana-de-açúcar) para a elaboração do hidromel.	16
Figura 5: Medidor da atividade da água.....	19
Figura 6: Coluna SPE-C18 usada para a extração dos compostos fenólicos.	20
Figura 7: Quantificação de coliformes totais e de E. coli com o sistema comercial SimPlate.....	24
Figura 8: Formulações preparadas dos mostos.....	25
Figura 9: Valores dos açúcares presentes no mel e melaço de cana-de-açúcar.	41
Figura 10: Resultados da densidade ótica e curva de crescimento microbiano durante a fermentação.	48
Figura 11: Azoto assimilável antes e após o ajuste nos mostos.	50
Figura 12: Azoto assimilável após a fermentação.....	52
Figura 13: Consumo de açúcares redutores durante a fermentação das bebidas fermentadas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatísticas descritivas da composição química do melaço de cana.....	7
Tabela 2: Classificação do hidromel com base em diversos fatores.	11
Tabela 3: Descrição da rampa de pressão e temperatura considerada.....	18
Tabela 4: Parâmetros de análise, matriz e periodicidade.	26
Tabela 5: Análises químicas dos substratos.	33
Tabela 6: Análises de humidade e teor de cinzas analisadas.....	36
Tabela 7: Comparação mineral entre os substratos usados na produção do hidromel. .	39
Tabela 8: Atividade da água das matrizes.	41
Tabela 9: Potencial bioativo: compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante.	44
Tabela 10: Análises microbiológicas dos substratos.	45
Tabela 11: Parâmetros de crescimento.	49
Tabela 12: Análise dos açúcares determinada pela metodologia DNS.	53
Tabela 13: Concentração dos açúcares finais determinados pelo HPLC.	55
Tabela 14: Resultados das análises químicas das bebidas fermentadas.	57
Tabela 15: Teor alcoólico das bebidas fermentadas e o rendimento alcoólico.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
a_w	Atividade da água
°Brix	Grau Brix
1 mol/L	1 mol por litro
Abs	Absorbância
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ATP	Trifosfato de adenosina
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose
CE	Eletroforese capilar
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
CO ₂	Dióxido de carbono
Densidade (SG)	Specific Gravity
DNS	ácido dinitrosalicílico
FC	Folin–Ciocalteu
g/L	Gramas por litro
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Kg	Quilograma
mg/L	Miligrama por litro
MS	Matéria seca
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCR	Normal Counting Range

ND	Não Detetável
CF	Compostos fenólicos
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial Hidrogeniónico
SPE	Extração em Fase Sólida
TFT	Teor de Flavonoides Totais
TCFT	Teor de Compostos Fenólicos Totais
TSS	Total Soluble Solids - sólidos solúveis totais
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

CAPÍTULO I

Introdução

1. ENQUADRAMENTO GERAL

O hidromel é uma das bebidas fermentadas mais antigas conhecidas, anterior mesmo à cerveja e ao vinho. A palavra hidromel deriva do grego antigo e significa literalmente “mel e água” (Felipe et al., 2019). Atualmente, é considerada uma das bebidas alcoólicas tradicionais à base de mel mais populares, com crescente reintrodução no mercado (Starowicz & Granvogl, 2020).

Em termos técnicos, o hidromel é uma bebida alcoólica obtida pela fermentação de uma solução aquosa de mel, conduzida por leveduras (Pereira et al., 2014), apresentando normalmente um teor alcoólico entre 8% e 18% (v/v). Para além do etanol, o hidromel contém uma variedade de compostos de interesse, incluindo açúcares residuais, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e antioxidantes (Fu et al., 2023), que contribuem para o seu valor nutricional e sensorial.

Embora o mel seja tradicionalmente o principal ingrediente utilizado na produção de hidromel, outras matérias-primas com características semelhantes, como o melaço de cana-de-açúcar, podem igualmente ser consideradas (Samaniego-Sánchez et al., 2020). O melaço é um subproduto espesso e viscoso resultante da refinação da sacarose proveniente da cana-de-açúcar (Guimarães et al., 2007). Trata-se de um produto rico em açúcares e sais minerais, muitas vezes classificado como resíduo industrial de baixo valor económico, apesar do seu potencial biotecnológico e nutricional (Mordenti et al., 2021).

Esta subvalorização do melaço evidencia a falta de estratégias eficazes para o seu reaproveitamento, constituindo, por isso, uma oportunidade promissora para o desenvolvimento de novos produtos fermentados. De facto, este subproduto da indústria açucareira apresenta uma composição rica em açúcares fermentáveis, vitaminas e minerais, que favorecem o crescimento e a atividade metabólica das leveduras durante a fermentação alcoólica. Tais características justificam a sua utilização como substrato alternativo ao mel na produção de bebidas fermentadas.

Além disso, a integração do melaço no processo produtivo poderá reduzir o desperdício de subprodutos agrícolas, reforçar a economia circular e promover a sustentabilidade ambiental e económica do sector agroindustrial, criando oportunidades de inovação e valorização de recursos locais (Kaur & Keshri, 2020).

Contudo, a aplicação do melaço como substrato na produção de bebidas alcoólicas apresenta desafios tecnológicos relevantes, nomeadamente a necessidade de ajustar parâmetros de fermentação, devido à sua elevada concentração de sais minerais e de compostos fenólicos, que podem afetar o desempenho das leveduras e a qualidade sensorial da bebida final. Apesar destes constrangimentos, estudos recentes indicam que, através da otimização das condições fermentativas e da seleção de estirpes de leveduras mais adaptadas, é possível obter bebidas de qualidade, com características organolépticas competitivas e custos de produção reduzidos.

Neste contexto, o presente estudo tem como propósito avaliar a viabilidade técnica da substituição parcial ou total do mel por melaço de cana-de-açúcar na produção de bebidas fermentadas, explorando o seu potencial como alternativa sustentável e economicamente vantajosa. Para além do contributo científico, esta investigação pretende promover a valorização de subprodutos agrícolas, fortalecer a economia local e incentivar a inovação no sector das bebidas fermentadas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo para a produção de bebidas fermentadas do tipo hidromel, através da comparação das suas propriedades físico-químicas e microbiológicas com as do hidromel tradicional elaborado exclusivamente com mel de abelha. Pretende-se, com este estudo, identificar as vantagens, limitações e implicações tecnológicas da aplicação do melaço, tendo em vista a sua utilização como solução sustentável, economicamente viável e tecnologicamente eficaz para a indústria de bebidas fermentadas.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar a composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar e do mel de abelha, com ênfase nos teores de açúcares, pH, acidez total e volátil, condutividade elétrica, teor de cinzas, atividade da água e conteúdo fenólico, com vista a compreender o seu impacto no processo fermentativo.
- Desenvolver formulações experimentais de bebidas fermentadas, utilizando mel, melaço e misturas em diferentes proporções, a fim de avaliar o comportamento fermentativo sob condições laboratoriais controladas.
- Monitorizar a cinética fermentativa das formulações, analisando parâmetros como a depleção de açúcares, produção de etanol, variação do pH, viabilidade celular e biomassa, de modo a avaliar a eficiência da fermentação em função da composição do substrato.
- Comparar os perfis físico-químicos e microbiológicos das bebidas obtidas, incluindo teor alcoólico, acidez, compostos fenólicos, teor de dióxido de enxofre e estabilidade, com especial atenção ao efeito da substituição parcial ou total do mel por melaço.
- Identificar os principais benefícios e desafios técnicos associados à incorporação do melaço na produção de hidromel, considerando tanto o desempenho fermentativo como os critérios de qualidade, sustentabilidade e custo-benefício.

CAPÍTULO II

Fundamentação teórica

Nesse capítulo, apresenta-se uma revisão da literatura que contextualiza o estado atual do conhecimento sobre o processo fermentativo do hidromel e o potencial de utilização do melaço como substrato alternativo ao uso de estirpes mais adaptadas, que pode resultar em bebidas fermentadas com características competitivas e acessíveis pelos consumidores.

2. MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

2.1. Definição e origem como subproduto da produção de açúcar

O melaço é um subproduto obtido como consequência de etapas seriais de repetidas evaporação, cristalização e centrifugação de sumo de cana-de-açúcar no processo de preparação do açúcar numa usina (Noureldin et al., 2020), de forma simplificada pode-se dizer que o melaço de cana é um xarope espesso obtido como um subproduto da fabricação ou refino da sacarose da cana-de-açúcar (Guimarães et al., 2007), cuja extração de açúcar já não é economicamente rentável, sendo rotulado como um subproduto da refinaria (Vaz, 2016).

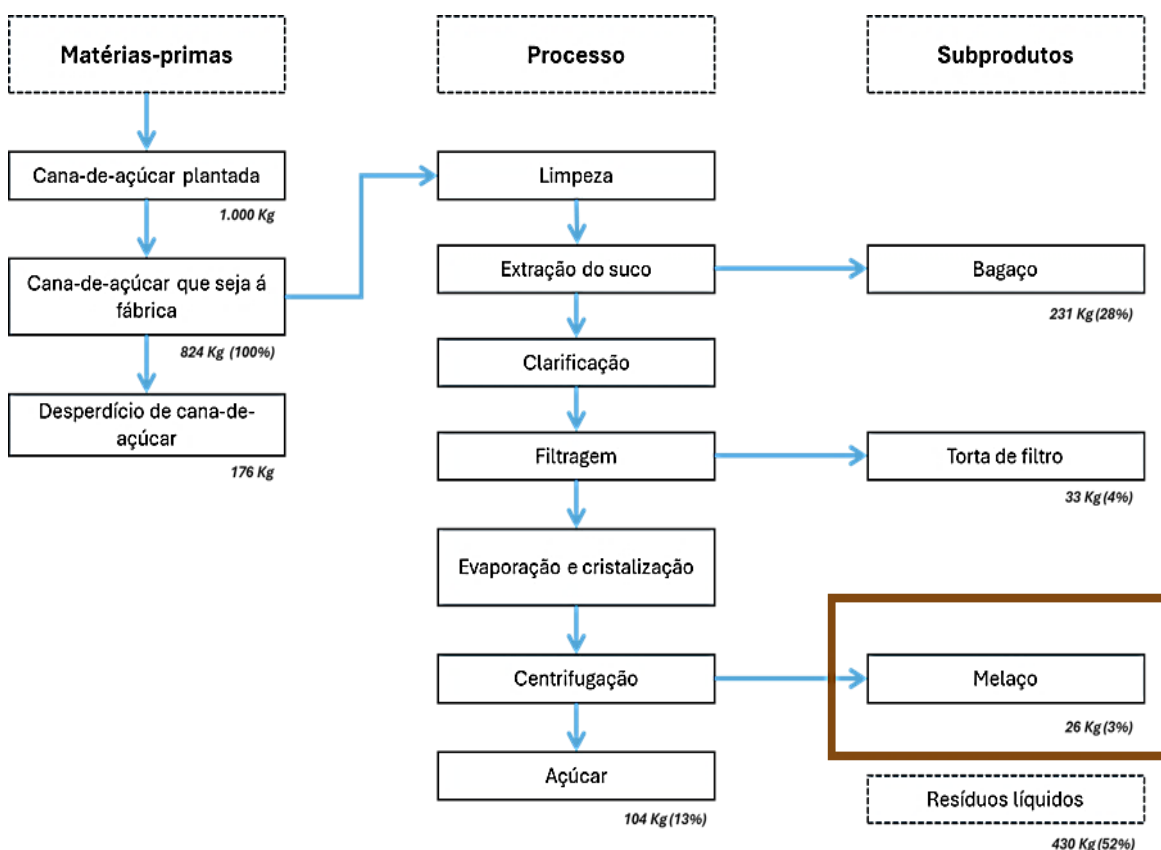


Figura 1: Processo de produção de açúcar e subprodutos.

Fonte: Almazan et al.,1998; Ochoa et al.,2010 e Makul & Sua-iam, 2016.

No processo de produção de açúcar a partir da cana-de-açúcar, existem três subprodutos principais denominados de bagaço, melaço e torta de filtro. A cada 824 kg de cana que são enviados para uma usina de açúcar apenas 104 Kg de açúcar é produzido e cerca de 26 Kg de melaço conforme a Figura 1, segundo (Pajampa & Wongwuttanasatian, 2023).

2.2. Composição e propriedades físico-químicos

Segundo Palmonari et al., (2020a), a composição da matéria seca do melaço de cana-de-açúcar variou entre cerca de 75,7% e 79,6%, com uma média bastante estável de 76,8%, isso mostra que a composição está bem equilibrada. Outro aspecto importante é o teor de cinzas, relativamente alto, com uma média de 13,1%. Indicando que há uma quantidade significativa de minerais presentes. No que diz respeito aos carboidratos, a sacarose é a principal componente, representando cerca de 48,8%. Além dela, também encontramos frutose e glicose, com médias de 8,1% e 5,3%, respectivamente.

Tabela 1: Estatísticas descritivas da composição química do melaço de cana.

Item	Média	DP	Mínimo	Máximo
MS (Matéria Seca)	76,8	1,0	75,7	79,6
PB (Proteína Bruta)	6,65	1,79	2,22	9,31
Açúcares totais	62,3	3,97	57,0	71,0
Sacarose	48,8	6,4	39,2	67,3
Glicose	5,29	2,69	1,30	12,07
Frutose	8,07	2,83	2,30	14,28
Raffinose	0,03	0,00	0,02	0,03
Galactose	0,04	0,01	0,04	0,04
Arabinose	0,01	0,02	0,00	0,04
Xilose	ND ¹	ND	ND	ND
Amido	0,33	0,25	0,06	1,07
Levana	0,86	0,26	0,26	1,21
Dextrinas	0,79	0,42	0,27	1,63
Arabanos	0,20	0,05	0,16	0,27
Ácido aconítico	1,42	0,85	0,24	3,78
Ácido láctico	6,10	2,82	1,62	12,75
Ácido málico	0,10	0,05	0,04	0,21
Ácido cítrico	0,13	0,04	0,08	0,22
Ácido pirúvico	0,34	0,13	0,18	0,51
Ácido oxálico	0,06	0,04	0,01	0,14
Ácido glicólico	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido acético	0,44	0,28	0,16	1,04
Cinzas	13,1	1,5	10,2	16,3
Cálcio (Ca)	1,39	0,55	0,82	3,13
Magnésio (Mg)	0,43	0,14	0,19	0,74
Sódio (Na)	0,08	0,10	0,01	0,44
Potássio (K)	1,82	0,91	0,31	7,99
Sulfatos	2,09	0,88	0,61	4,10
Enxofre ²	0,69	0,27	0,27	1,36
Fosfatos	2,03	0,77	1,00	2,97
Nitratos, mg/kg	464	337	17	999
Cloretos, mg/kg	60	86	1	340

¹ND - não detetável; DP - desvio padrão.

²Enxofre obtido a partir de sulfatos, considerando seus respectivos pesos moleculares".

Fonte: Palmonari et al. (2020b).

Por outro lado, os ácidos orgânicos, como o ácido lático e o ácido aconítico, estão presentes em quantidades significativas no melaço de cana, sendo que o ácido lático pode chegar a representar até 12,8% da matéria seca (Tabela 1).

De um modo geral, o melaço é constituído por uma elevada quantidade de açúcares, como a sacarose, glicose e frutose (Barros, 2023), é uma fonte importante de minerais como potássio, cálcio, magnésio e ferro, além da presença vitaminas do complexo B (tiamina e vitamina B12) em quantidades baixas segundo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, (sem data). Resumindo, embora o melaço de cana seja uma ótima fonte de açúcares fermentáveis, ele também contém minerais, ácidos e outros compostos (Palmonari et al., 2020b).

Segundo Kong et al. (2016), o melaço de cana-de-açúcar é uma fonte rica em compostos fenólicos que trazem benefícios à saúde. Os autores destacam que esse subproduto apresentou propriedades biológicas significativas, com efeitos antioxidantes potentes, além de ações anti-mutagénicas, anti-inflamatórias e inibidoras da enzima tirosinase. Esses resultados indicam o potencial funcional do melaço e sua relevância como ingrediente bioativo.

2.3. Uso industrial e potencial fermentativo

As tecnologias modernas permitem a transformação do melaço em diversos produtos com alto valor agregado (Figura 2). Sua versatilidade se estende a aplicações em bebidas, produção de ácido acético, cultivo de levedura de panificação, processos de fermentação e utilização como componente em ração animal e fertilizantes (Geremew Kassa et al., 2024).

O melaço é um depósito renovável que se regenera a cada ano. Ele abrange uma composição química única com um amplo espectro de efeitos (El Asri & Farag, 2023) e o seu consumo tem sido associado à redução das respostas de pico e de glicose oral, além

de aumentar os níveis de insulina, amilina e polipeptídeos inibitórios gástricos após a ingestão oral (Geremew Kassa et al., 2024).

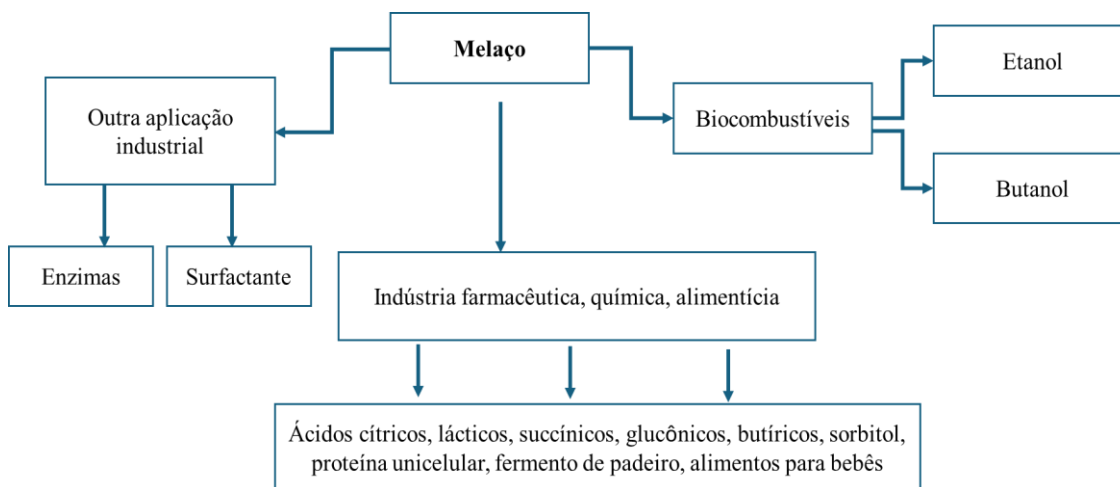


Figura 2: Aplicação industrial do melaço.

Fonte: Jamir et al., 2021.

O melaço destaca-se como um excelente substrato fermentativo devido à sua composição rica em carboidratos fermentáveis, como sacarose, glicose e frutose,(Figura 3) além de materiais orgânicos não açucarados, como aminoácidos, minerais e vitaminas (Samaniego-Sánchez et al., 2020), que favorece o crescimento de microrganismos em processos fermentativos industriais, sendo amplamente utilizado na produção de etanol, ácido cítrico e outros compostos de alto valor agregado (Rabelo et al., 2009; Taherzadeh & Karimi, 2007).

Conforme apresentado na Tabela 1, o melaço contém oligossacarídeos e nutrientes essenciais que potencializam a eficiência da fermentação e a produtividade de microrganismos utilizados nesses processos. Devido ao seu alto teor de carboidratos e preço razoavelmente baixo, o melaço de cana é considerado um substrato excepcional para fermentação (Jamir et al., 2021).

3. HIDROMEL

3.1. Definição

Hidromel é uma bebida alcoólica tradicional, contendo 8–18% (v/v) de etanol, preparada pela fermentação do mel. A taxa de fermentação depende especialmente da variedade do mel, da cepa de levedura, da nutrição da levedura e do controle do pH (Navrátil et al., 2001). O mosto de hidromel é produzido através da diluição do mel de abelha com a quantidade adequada de água. Dependendo da proporção em que o mel é diluído, obtêm-se diferentes tipos de hidromel (Sroka & Tuszyński, 2007).

3.2. História e Produção

Segundo Sroka & Tuszyński (2007), o hidromel é uma bebida alcoólica produzida desde a antiguidade, apesar de séculos de tradição na produção de hidromel na Polónia, tem sofrido nos últimos anos devido à falta de evolução científica na área.

Antigamente, o hidromel era produzido pela fermentação do mel em água e apresentava baixa qualidade, subprodutos indesejados, sabores estranhos e a produção era demorada (Felipe et al., 2019).

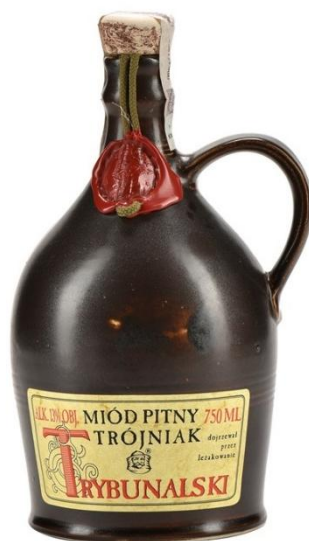


Figura 3: Hidromel Polonês.

Fonte: <https://www.meadworld.com/meaderies/poland/pasieka-jaros/miod-pitny-trojniak--trybunalski-3>

3.3. Classificação do Hidromel

O hidromel pode ser classificado em seco, licoroso, doce e espumoso, segundo a sua tecnologia de fabrico. Esta produção depende do tempo de fermentação, da quantidade de mel utilizada e da graduação alcoólica resultante da adição de aguardente vínica (Gomes, 2010). Além da classificação segundo a sua tecnologia de fabrico, existem

outros fatores como teor alcoólico, dulçor, composição e adição de ingredientes, carbonatação e envelhecimento. Esses detalhes são apresentados na Tabela 2, que amplia a visão sobre a diversidade de tipos de hidromel.

Tabela 2: Classificação do hidromel com base em diversos fatores.

Classificação do Hidromel	
Categoria	Subcategoria
Teor alcoólico	<ul style="list-style-type: none"> · Hidromel Fraco ou Suave (Low mead) · Hidromel Médio · Hidromel Forte (Sack mead)
Dulçor	<ul style="list-style-type: none"> · Hidromel Seco · Hidromel Meio-Seco · Hidromel Doce
Composição e adição de ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> · Tradicional. · Melomel: ex: Cyser e Pyment · Metheglin · Braggot · Bochet · Rhodomel
Método de produção	<ul style="list-style-type: none"> · Hidromel Natural · Hidromel Enriquecido
Carbonatação	<ul style="list-style-type: none"> · Hidromel Tranquilo · Hidromel Frisante · Hidromel Espumante
Envelhecimento	<ul style="list-style-type: none"> · Jovem · Envelhecido

Fonte: Adaptado de McGovern et al., (2004); Stewart, (2010); Catelli, et al. (2015) e Buchanan, (2006).

3.4. Processo de produção

A obtenção do hidromel segue procedimentos semelhantes de fabricação de um vinho de uva (Mattietto et al., 2006), de acordo com Gupta e Sharma (2009), a elaboração de hidromel é um processo complexo que envolve diversos fatores, como a qualidade das matérias-primas utilizadas, a escolha dos microrganismos fermentadores, o uso de aditivos específicos, as práticas aplicadas durante a vinificação e o controle rigoroso do processo de maturação.

O processo de produção do hidromel apresenta os seguintes passos: diluição do mel, preparação do mosto, inoculação e fermentação, sifonagem e clarificação, pasteurização e engarrafamento e maturação.

*** Diluição do mel**

É o processo que se inicia com a diluição do mel em água, visando obter um mosto com composição adequada à fermentação. Segundo Pereira et al (2015), essa etapa é fundamental para ajustar o teor de açúcar e garantir a viabilidade do processo fermentativo.

*** Preparação do mosto**

Após a diluição, o mosto é ajustado quanto à acidez e suplementado com nutrientes essenciais para o desenvolvimento das leveduras, conforme destacado por Felipe et al., (2019). Essa etapa assegura condições ótimas para o metabolismo dos microrganismos.

*** Inoculação e fermentação**

O mosto é inoculado com uma cultura de leveduras, normalmente do gênero *Saccharomyces* (Ramalhosa et al., 2011). Nessa etapa os açúcares são convertidos em etanol e outros compostos secundários que contribuem para o perfil sensorial do hidromel (Fu et al., 2023).

*** Sifonagem e clarificação**

Após a fermentação, ocorre a separação dos sedimentos, como células de leveduras inativas e resíduos, por meio de sifonagem ou processos de clarificação, melhorando a limpidez da bebida (Gupta & Sharma, 2009).

* Pasteurização e engarrafamento

Para garantir a estabilidade microbiológica e evitar fermentações secundárias, o hidromel é pasteurizado, frequentemente a 62,5°C por 15 minutos (Gupta & Sharma, 2009), e posteriormente engarrafado.

* Maturação

O hidromel engarrafado é submetido a um período de maturação, no qual ocorrem transformações químicas que aprimoram os aromas e sabores, resultando em uma bebida equilibrada e de alta qualidade sensorial (Ramalhosa et al., 2011).

Essas etapas demonstram a complexidade e o cuidado técnico necessários para a produção de hidromel, evidenciando a interação entre ciência e arte no desenvolvimento dessa bebida tradicional. A Figura 4 ilustra o esquema do processo de produção clássica de hidromel.

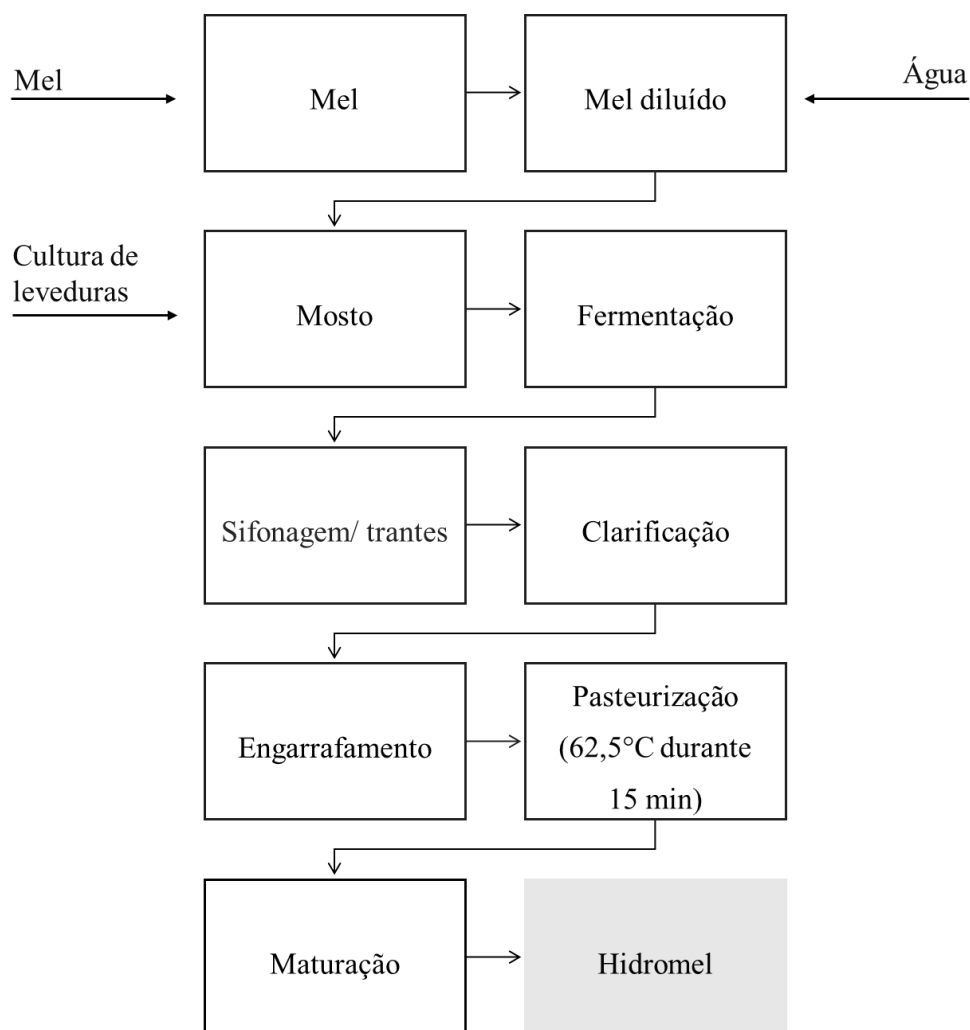


Figura 4: Fluxograma de diferentes operações unitárias na produção de hidromel.
Fonte: Adaptado de (Mattietto et al., 2006) & (Gupta & Sharma, 2009).

3.5. Teor alcoólico e leveduras

O teor alcoólico da bebida pode variar significativamente, situando-se entre 7% e 22%, estando sujeito a proporção de mel e água utilizada, bem como do momento estratégico em que o processo de fermentação é interrompido. Esses parâmetros permitem a obtenção de diferentes tipos de hidromel, com características únicas e adaptadas a diferentes paladares e finalidades, segundo Gupta e Sharma (2009).

De acordo com Fu et al. (2023), o processo de fermentação do hidromel geralmente faz uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é amplamente reconhecida como a mais utilizada nesse tipo de produção. Essa escolha deve-se, sobretudo, à sua eficiência na conversão dos açúcares presentes no mel em etanol e compostos aromáticos, além de sua capacidade de adaptação às condições do mosto, como alta concentração de açúcares e baixos níveis de pH. A utilização de *S. cerevisiae* também contribui significativamente para o desenvolvimento do perfil sensorial do hidromel, devido à sua produção de metabólitos secundários que enriquecem os aromas e sabores da bebida, tornando-a mais complexa e apreciada. Assim, a escolha dessa levedura não é apenas técnica, mas estratégica, para obter um produto de qualidade

CAPÍTULO III

Metodología

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade de utilização de melaço de cana-de-açúcar e de mel de abelha como substratos na produção de bebidas fermentadas, com foco nos aspectos físico-químicos e microbiológicos, bem como na comparação do rendimento fermentativo. Todas as análises foram efetuadas em triplicado.

4.1. Amostras de mel e melaço de cana-de-açúcar

Para o estudo, foram escolhidas amostras de mel multifloral e de melaço de cana-de-açúcar, ambos produzidos em sistemas de agricultura orgânica e adquiridos diretamente no mercado local. Reagentes e consumíveis, como água destilada, nutrientes para leveduras e soluções tampão, adquiridos em empresas especializadas e pertencentes ao laboratório de Microbiologia do IPB.



Figura 4: Matéria-prima (mel multifloral e melaço de cana-de-açúcar) para a elaboração do hidromel.

4.2. Caracterização físico-química do mel e do melaço de cana-de-açúcar

As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, de forma cuidadosa, para manter suas características até ao momento das análises laboratoriais detalhadas.

4.2.1. pH

Tanto o pH do mel quanto do melaço, foram medidos usando o método descrito por Bogdanov et al., (1997). Primeiro, foi dissolvida uma amostra de 10 g em 75 ml de água destilada, em um béquer de 250 ml. A mistura foi agitada com um agitador magnético, e o eletrodo de pH foi colocado na solução para registrar o valor de pH.

4.2.2. Acidez livre

Segundo a AOAC (1990), o método oficial 962,19 é utilizado para determinação da acidez livre, uma amostra de 10 g foi dissolvida em 75 ml de água destilada, usando um béquer de 250 ml. Depois, foram adicionadas quatro gotas de solução de fenolftaleína. Em seguida, foi realizada uma titulação com uma solução de NaOH 0,1 M, até que a cor mudasse e permanecesse durante 10 segundos, ou até atingir pH 8,30. A titulação foi concluída em até dois minutos (Bogdanov, 2009). A acidez livre (miliequivalentes de ácido por Kg) foi determinada usando a seguinte equação:

$$\text{Acidez livre} \left(\frac{\text{meq}}{\text{Kg}} \right) = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Onde:

V_{NaOH} = volume de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação (em mL).

O fator 10 resulta da conversão para miliequivalentes por kg de mel, considerando a amostra de 10 g.

4.2.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi determinada pelo método de Sancho et al. (1991): pesar 10 g da amostra e dissolvê-la em 75 ml de água destilada. A solução foi colocada no banho-maria a 20 °C até se estabilizar. De seguida, fez-se a leitura da condutividade elétrica num condutímetro calibrado. O valor que foi obtido foi multiplicado por 1,5 e os resultados foram apresentados com $mS/cm(10^{-3}S/cm)$.

4.2.4. Humidade

A humidade foi determinada conforme o método oficial AOAC 940.26 (1990). Para isso, realizou-se a pesagem em cadinho de porcelana previamente tarado, utilizando balança analítica de precisão e depois realizou-se a secagem na estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ até que o peso se estabilizasse, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens consecutivas fosse menor que 0,001 g.

4.2.5. Cinzas totais

A determinação do teor de cinzas das amostras anteriormente usadas para calcular a humidade segundo AOAC, (2005). Já com a matéria seca, iniciou-se logo pela incineração das amostras na mufla a uma temperatura elevada de 550°C por 5 a 6 horas, até a completa eliminação da matéria orgânica e permitir medir o resíduo inorgânico que

são as cinzas, de seguida a cápsula foi transferida da mufla com pinça metálica para o exsiccador para esfriar e por fim pesar e calcular a massa final das cinzas através da seguinte equação.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \left(\frac{\text{massa de cinzas}}{\text{massa da amostra inicial}} \right) \times 100$$

4.2.6. Perfil mineral

Para a digestão das amostras mel ou melaço segundo a referência MARS 6™, CEM, Method Note - Microwave Digestion of Honey (Raw). A digestão da amostra foi em vaso fechado com assistência do micro-ondas. Pesou-se rigorosamente cerca de 0,3 g de amostra para o vaso de digestão e adicionou-se 10 mL de HNO₃ concentrado; colocou-se os vasos de digestão com a amostra e ácido num banho-maria (~90°C) durante cerca de 15 minutos. Agitou-se o conteúdo com cuidado e arrefeceu-se os vasos de digestão, em água fria, durante cerca de 10 minutos; após, fechar os vasos de digestão efetuou-se a digestão do conteúdo com assistência do micro-ondas. Rampa de pressão e temperatura considerada está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição da rampa de pressão e temperatura considerada.

Etapa	T/°C	Rampa/min	Mantém/min	Pressão/psi	P/W
1	200	20	15	800	900-1050

Após arrefecimento dos vasos de digestão, diluiu-se as amostras, com 30 mL de água desionizada e efetuou-se a quantificação dos metais pesados por espectrofotometria de absorção atómica.

4.2.7. Atividade da água (a_w)

A determinação da atividade da água (a_w) nas amostras do mel e do melaço foi medida usando um equipamento específico, o Novasina LabSwift-aw (Figura 5).

Primeiro, as amostras foram pesadas com cuidado em recipientes adequados fornecidos pelo fabricante, até atingirem o volume recomendado. Depois, esses recipientes foram colocados no aparelho de leitura sem tampa.

Antes das medições, o aparelho foi calibrado usando uma solução padrão de brometo de sódio (NaBr), que possui uma atividade da água de 0,584 (58%), conforme as orientações do fabricante.



Figura 5: Medidor da atividade da água.

4.2.8. Teor de açúcares

A determinação do teor da sacarose, glicose e frutose nas matérias-primas, foi feita por cromatografia em fase líquida de alta performance, com detecção por índice de refração (HPLC-IR). O meloço e o mel foram previamente diluídos em água na proporção 1:25 (meloço: água) e 1:20 (mel: água), de seguida, as soluções foram filtradas antes das análises com o auxílio de uma seringa, através de um filtro de nylon com porosidade de 0,2 μm , segundo a metodologia de Correia et al., 2014.

4.3. Análise do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante

4.3.1. Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos presentes no mel foi realizada seguindo o método descrito por Truchado et al. (2009), com algumas adaptações segundo Paula et al. (2024). Para isso, utilizamos a técnica de extração em fase sólida (SPE) com coluna C18 (Figura 6). Este método é eficiente na remoção de interferentes, como açúcares e outros compostos orgânicos, que podem dificultar a identificação e a medição precisas dos compostos fenólicos.

Uma vez que as colunas SPE-C18 têm afinidade por compostos apolares e semi-polares, ajudando a concentrar especificamente os fenólicos, o que aumenta a sensibilidade e a confiabilidade dos resultados das análises.

Para preparar a amostra, foram utilizados exatamente 10 g de mel e 1 g de melaço de cana-de-açúcar, ambos dissolvidos em 50 mL e 20 mL, respectivamente, de uma solução de HCl de pH 2. A seguir, a coluna SPE-C18 foi fixada na câmara de manifold e ativada com 10 mL de metanol e 10 mL de água desionizada.

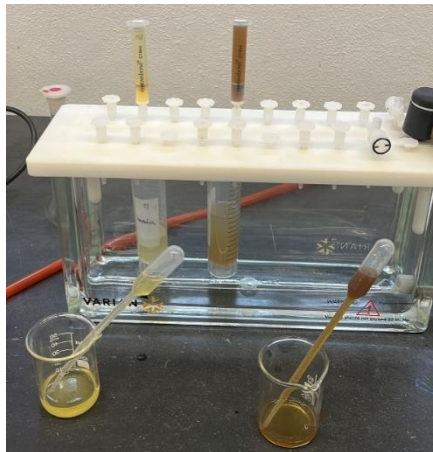


Figura 6: Coluna SPE-C18 usada para a extração dos compostos fenólicos.

Depois, foi feita a aplicação das soluções sobre a coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de água deionizada. Para extrair os compostos fenólicos da coluna SPE-C18, utilizou-se 4 mL de metanol. Essa solução extraída foi utilizada para realizar as análises de teor de compostos fenólicos totais (TCFT), teor em flavonoides totais (TFT) e análise da capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP.

4.3.2. Determinação de compostos fenólicos totais

O teor total de compostos fenólicos presentes no mel foi determinado em microplacas segundo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (método FC), proposto por Singleton e colaboradores e com pequenas alterações feitas por (Majewska & Drużyńska, 2025). Este método baseia-se na reação dos compostos fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu, resultando na formação de um complexo de cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração destes compostos.

Para a determinação do teor total de compostos fenólicos (TCFT), foram pipetados 20 μ L da solução extraída, previamente diluída na proporção de 1:5 para o mel e 1:10 para o melaço em microplacas, aos quais se adicionaram 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (1:4). Após 4 minutos de reação, foram acrescentados 75 μ L de solução de carbonato de

cálcio (100 g/L). As amostras permaneceram em repouso no escuro durante 2 horas, e, em seguida, a leitura da absorbância foi realizada a 740 nm.

Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g), com base numa curva de calibração construída a partir de soluções padrão de ácido gálico (20-250 mg/L).

4.3.3. Determinação de flavonoides totais

A determinação do teor total de flavonoides (TFT) foi realizada através de um método colorimétrico baseado na formação de um complexo com cloreto de alumínio (AlCl_3), de acordo com metodologias descritas em (Ghadigaonkar et al., 2021), com as devidas adaptações às condições experimentais deste trabalho.

Para a análise, recorreu-se à mesma solução obtida na extração em fase sólida (SPE-C18), previamente diluída (1:5 para o mel e 1:10 para o melão). Em microplacas, foram adicionados 50 μL da amostra, seguidos de 10 μL de solução de cloreto de alumínio a 10%, 150 μL de etanol e 10 μL de solução de acetato de sódio (1 M).

As microplacas foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, durante 40 minutos. Após este período, a leitura da absorbância foi realizada a 415 nm. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EQ/g), com base numa curva de calibração construída a partir de soluções padrão de quercetina (0-50 mg/L).

4.3.4. Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP

Para avaliar o poder redutor férrico (FRAP), optou-se por um procedimento direto em microplaca seguindo a metodologia descrita por Bolaños de la Torre et al. (2015), que oferece leituras estáveis e permite comparar amostras de forma clara. Em cada poço foram adicionados 20 μL do extrato diluído (preparado previamente, SPE-C18) mais 280 μL do reagente FRAP (o reagente foi preparado utilizando uma solução tampão de 0,3 M de ácido acético de sódio tri-hidratado ($\text{CH}_3\text{COOH}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a pH 3,6, à qual foram adicionados ácido acético glacial, uma solução de TPTZ ($1,0 \times 10^{-2}$ M) dissolvido em HCl 40mM e uma solução de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,0 \times 10^{-2}$ M), numa proporção de volumes de 10:1:1), agitar durante 60 segundos e deixar a reação acontecer no escuro a 37 °C por 30 minutos e por fim, ler a absorbância de 593 nm. A quantificação fez-se por comparação com uma curva de calibração preparada com padrão de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19-

314 mg/L). Os resultados foram expressos em equivalente de ferro II por grama de amostra (mg EFeII/g).

4.3.5. Redução do radical livre DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante por DPPH foi baseada na metodologia descrito por Bobo-García et al. (2014) num procedimento usando microplaca. Primeiramente, foram adicionados 20 µL da amostra a 180 µL da solução de DPPH (150 µmol/L), misturando suavemente e deixar no escuro durante 40 minutos à temperatura ambiente. No fim, foi lida a absorbância a 515 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de trolox por grama de amostra e com base numa curva de calibração construída a partir da solução padrão de trolox (25-151 mg/L).

4.4. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas das matérias-primas foram realizadas com o objetivo de avaliar a qualidade higiossanitária e a viabilidade microbiana dos substratos utilizados no processo fermentativo. Este tipo de avaliação é essencial para determinar a presença e a dinâmica dos microrganismos naturalmente associados ao meio, uma vez que estes podem influenciar de forma significativa o desempenho fermentativo, a estabilidade do produto final e a segurança alimentar.

Para determinar quantos microrganismos estavam na amostra (exceto quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli*), foi usado a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\sum \text{colónias(contagens)}}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

4.4.1. Determinação quantitativa de *Bacillus cereus*

O procedimento foi realizado por meio de um cultivo em meio seletivo, enriquecido com gema de ovo, seguindo os protocolos adaptados da ISO 7932:2004. As análises foram feitas a partir de diluições decimais 10^{-1} e 10^{-2} , preparadas em água peptonada estéril. As amostras de mel e melaço foram efetuadas em duplicado. A inoculação foi realizada por espalhamento superficial. As placas foram incubadas a 30 °C por ± 48 horas em uma estufa bacteriológica. A contagem das colónias foi realizada observando as colónias típicas em meios contendo gema de ovo, que ajudam na deteção de atividades lipolíticas e hemolíticas relacionadas à espécie.

4.4.2. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas totais

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais foi realizada usando o método de cultivo em Ágar Padrão para Contagem (PCA) de acordo com ISSO 4833-1:2013. Foram realizadas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em água peptonada.

As amostras de mel e melaço foram semeadas em triplicado para cada diluição. A semeadura foi feita pelo método de incorporação: 1 mL da diluição foi depositado em uma placa estéril antes do meio ainda estar fundido. Depois, as placas foram homogeneizadas com uma leve agitação e deixadas para solidificar. A incubação foi feita a 30°C por 48 horas a 72 horas.

4.4.3. Quantificação de fungos filamentosos e leveduras

A contagem de fungos e leveduras foi feita usando o meio ágar rosa de Bengala com cloranfenicol, que ajuda a inibir bactérias e favorece o crescimento de fungos, segundo a norma ISO 21527-2:2008. Para isso, prepararam-se diluições de 10^{-1} e 10^{-2} em água peptonada estéril. As amostras de mel e melaço foram semeadas em duas placas para cada diluição, totalizando oito placas. A inoculação foi feita por espalhamento superficial sobre as placas. Depois, as amostras foram incubadas a 25 °C por 48 a 73 horas na estufa microbiológica.

4.4.4. Detecção e quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*

A quantificação de coliformes totais e *E. coli* nas amostras de mel e melaço foi feita usando o sistema comercial SimPlate. Esse método permite detectar os dois grupos de bactérias ao mesmo tempo, em uma única placa. Ele é baseado em tecnologia de substratos cromogénicos e fluorogénicos, e os resultados são apresentados como NMP (Número Mais Provável), conforme a tabela NCR fornecida pelo fabricante. Para começar, preparou-se uma solução diluída da amostra em água peptonada estéril. Nesse passo, adicionou-se 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} das amostras ao meio SimPlate, seguindo o protocolo recomendado. Depois, a mistura foi homogeneizada com cuidado e distribuída uniformemente sobre os poços da placa SimPlate (84 poços; Figura 7). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em uma estufa bacteriológica. Para

interpretar o número de poços positivos, utilizamos a tabela de conversão NCR, fornecida pelo fabricante.

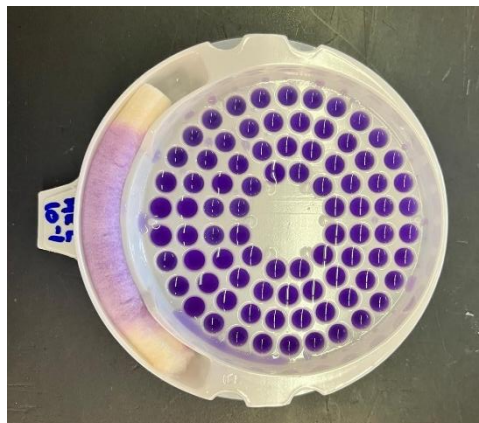


Figura 7: Quantificação de coliformes totais e de *E. coli* com o sistema comercial SimPlate.

4.5. Procedimento técnico e experimental para a produção das bebidas fermentadas

Para compreender melhor o mosto antes da fermentação e avaliar a qualidade das bebidas fermentadas finais, as seguintes análises físico-químicas foram feitas em triplicado, tanto no início quanto no final das fermentações. No começo, foi medido o pH, o teor de açúcares solúveis (em °Brix), a acidez total e o nitrogênio assimilável, além da biomassa celular e assim conseguir caracterizar detalhadamente o mosto. Já no final da fermentação, as análises realizadas foram o pH, o teor de dióxido de enxofre total (SO₂), a acidez total e volátil, o nitrogênio assimilável e o teor alcoólico das bebidas fermentadas.

4.5.1. Preparação dos mostos

A preparação do mosto (Figura 8) foi realizada com o objetivo de atingir um grau alcoólico desejado, estimado entre 10% e 13% v/v. Essa faixa foi escolhida para garantir um perfil sensorial equilibrado e uma fermentação segura. Para obter esse teor alcoólico, calculamos os teores iniciais de açúcares fermentáveis necessários, com base no °Brix inicial de 20. De seguida, os mostos foram preparados em diferentes proporções (100% mel, 50/50 de mel e melaço e 100% melaço). Após a diluição, realizou-se a suplementação nutricional conforme as recomendações do fabricante. O pH de cada formulação foi ajustado com ácido tartárico (para redução do pH) ou com carbonato de cálcio (para elevação do pH do mosto, nos casos em que o mel apresentava valores inferiores aos recomendados para o início da fermentação), garantindo que o pH final se situasse entre 3,8 e 4,0.

Para garantir a segurança microbiológica sem alterar as características sensoriais do mosto, todas as formulações passaram por uma pasteurização a 70°C por 30 minutos, feita em autoclave controlado. Esse procedimento ajudou a reduzir a carga microbiana inicial, sem causar uma desnaturação significativa dos compostos aromáticos e fenólicos presentes no mel e no melaço.



Figura 8: Formulações preparadas dos mostos.

4.5.2. Hidratação da levedura

Para o processo de fermentação dos mostos, foi escolhida a levedura seca *S. cerevisiae* QSA23, uma estirpe com elevada capacidade fermentativa, amplamente utilizada em processos fermentativos devido à sua eficiência na conversão de açúcares em etanol. Apresenta boa tolerância a elevadas concentrações de açúcar e etanol, bem como adaptação a condições de pH ácido, características relevantes para fermentações de mostos. Esta estirpe também é reconhecida por sua estabilidade fermentativa e baixa produção de compostos indesejáveis, o que contribui para um perfil sensorial equilibrado do produto final.

A levedura foi previamente reidratada em água estéril, a uma temperatura controlada (37°C) durante 30 minutos, sem agitação, conforme as recomendações do fabricante. Após a reidratação, a suspensão foi homogeneizada e gradualmente adaptada ao mosto antes da inoculação, de modo a minimizar o stress osmótico e térmico.

A sua hidratação foi realizada seguindo as orientações da ficha técnica do fabricante. Após a mistura, foi cuidadosamente colocada em banho-maria à temperatura de 37°C por 30 minutos, com agitações suaves.

4.5.3. Condições e monitorização da fermentação

Para o processo de fermentação, foram distribuídos 2,5 L de mosto (mel, melaço e combinação 50/50) em Erlenmeyer de 3 L (previamente esterilizados). Em seguida, foi inoculada com a levedura selecionada anteriormente hidratada.

As fermentações foram realizadas à temperatura controlada de 25°C, com agitação constante, proporcionando um meio ideal para o crescimento das leveduras. O progresso fermentativo foi acompanhado de perto diariamente com medições da biomassa celular, da viabilidade das células e da concentração de açúcares redutores e cada uma delas em duplicado. Essas análises têm por objetivo avaliar o ritmo do processo fermentativo. O tempo total das fermentações foi aproximadamente 7 dias.

4.5.4. Caracterização físico-química e microbiológica do mosto e do produto final

As análises que foram realizadas desde a preparação do mosto até à obtenção do produto final, estão resumidas na Tabela 4. Nela, também está indicada a etapa específica em que cada parâmetro foi analisado.

Tabela 4: Parâmetros de análise, matriz e periodicidade.

Parâmetro	Matriz analisada	Periodicidade da análise
pH	Mosto e Hidromel	Início e final da fermentação
°Brix	Mosto/Hidromel	Início e final da fermentação
Açúcares redutores	Mosto e Hidromel	Diariamente
Acidez total	Mosto e Hidromel	Início e final da fermentação
Biomassa Celular	Mosto	Diariamente
Viabilidade celular	Mosto	Diariamente
Acidez volátil	Hidromel	Final da fermentação
Nitrogênio assimilável (YAN)	Mosto e Hidromel	Início e final da fermentação
Teor alcoólico (% v/v)	Hidromel	Final da fermentação
Dióxido de enxofre total (SO ₂)	Hidromel	Final da fermentação
Rendimento da fermentação	Hidromel	Cálculo final

4.5.5. pH

O pH do mosto e do hidromel foram feitas pela leitura direta usando um pHmetro digital, que foi calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00, a uma temperatura de cerca de 25°C (mais ou menos 1 grau), seguindo as orientações da Organização Internacional de la Vigne et du Vin (OIV, 2019).

Para cada amostra, foram retirados 10 mL do mosto e do hidromel, colocados num erlemeyer limpo e seco. O eletrodo do pHmetro foi mergulhado diretamente na amostra, garantindo que estivesse totalmente submerso. A leitura foi feita quando valor no visor parou de oscilar, anotando o pH com duas casas decimais. Entre uma medição e outra, o eletrodo foi enxaguado com água.

4.5.6. Teor de açúcares solúveis (em °brix)

O teor de °Brix do mosto foi medida com o auxílio de um refratômetro portátil, de acordo com o método recomendado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2006).

4.5.7. Acidez total

Para medir a acidez total do mosto e do hidromel, foi baseada no método segundo OIV (1990). Essa técnica consiste em uma titulação potenciométrica com solução de NaOH 0,1 N, utilizando o azul de bromotimol como indicador visual do pH. Primeiro, foram adicionados 30 mL de água destilada, 10 mL da amostra e 1 mL do indicador em um almofariz de porcelana. Com o auxílio de uma barra magnética, a solução foi homogeneizada, de seguida foi adicionado lentamente a solução de NaOH até se verificar a mudança de cor de um laranja intenso para um verde com tonalidades azuladas segundo Pereira et al., (2013), esse é o sinal que chegou no ponto final da titulação. A partir dessa leitura, foi calculada a acidez total em gramas por litro de ácido tartárico utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Acidez total ácido tartárico (g/L)} = \text{volume de NaOH gasto (mL)} \times 0,75$$

4.5.8. Azoto assimilável

Para determinar a quantidade de azoto que as leveduras podem absorver no mosto e no hidromel, baseou-se na metodologia do formaldeído, que segue a técnica descrita por

Aerny (1996). Primeiramente, foram adicionados num copo (de 50 mL) 10 mL da solução clarificada (centrifugada) e 15 mL de água destilada e cuidadosamente ajustando o pH para 8,1 com solução de NaOH 0,1 N, com auxílio de um pHmetro.

Logo após o ajuste, foi adicionado 2,5 mL de formaldeído a pH 8,1 (formaldeído a 37 % acertada a pH 8,1 com NaOH 0,1 N) e aguardar cinco minutos para a reação acontecer. Por fim, fazer a titulação com NaOH 0,05 N até que o pH volte a atingir 8,1, conforme orientações de Pereira et al. (2013).

A quantidade de azoto absorvível foi então calculada usando a fórmula:

$$\text{Azoto assimilável (mg/L)} = \text{volume de NaOH utilizado (L)} \times 70$$

4.5.9. Biomassa celular

O cálculo da biomassa celular serve para acompanhar o crescimento das células durante a fermentação. A medição da biomassa celular foi pela densidade ótica a 640 nm, usando um espectrofotômetro UV-Visível. Quando necessário, em que as amostras apresentaram valores fora da faixa ideal procedeu-se à diluição, que foi utilizado também como referência (branco) nas medições.

As taxas específicas de crescimento (μ c) foram calculadas com base na inclinação da curva que relaciona os valores da densidade ótica e o tempo de fermentação. Essa relação é descrita pela equação:

$$\ln Nt = \ln N0 + \mu t$$

onde μ representa a taxa de crescimento específica expressa em unidades do inverso do tempo (h^{-1}), Nt e $N0$ são as densidades populacionais no fim do tempo t e no tempo inicial t_0 , respetivamente, calculadas a partir das leituras óticas a 640 nm.

4.5.10. Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular foi através da quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs), cultivadas num meio sólido Yeast Peptone Dextrose (YPD).

Sempre que necessário, as amostras foram diluídas antes de distribuir nas placas, de seguida foram incubadas a 25 °C, durante um período de 48 horas, permitindo assim o crescimento e a observação das colónias formadas.

4.5.11. Açúcares redutores

Para avaliar o desenrolar da fermentação e do hidromel, retiraram-se periodicamente 2 mL de amostra para quantificação da sacarose, glicose e frutose foram determinadas pelo método DNS, de acordo com o método descrito por Miller (1959). Dado que a sacarose, na sua forma original, não possui propriedades redutoras, procedeu-se à hidrólise prévia das amostras, de modo a converter a sacarose em glicose e frutose. Esta etapa foi essencial para a determinação indireta da concentração total de sacarose. Primeiramente foi adicionado a 500 µL de amostra (diluída quando necessário), 500 µL de reagente DNS, deixar durante 5 minutos em banho-maria a 100°C e arrefecer à temperatura ambiente. Por fim, adicionar 5 mL de água destilada e ler a absorbância a 540 nm.

Complementando a metodologia anterior, procedeu-se à quantificação dos açúcares finais por cromatografia em fase líquida de alta performance, com deteção por índice de refração (HPLC-IR). As amostras foram filtradas com o auxílio de uma seringa, através de um filtro de nylon com porosidade de 0,2 µm.

4.5.12. Acidez volátil

A determinação da acidez volátil do hidromel foi determinada segundo o método descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 1990), baseada na titulação dos ácidos voláteis extraídos por destilação, utilizando o aparelho Cazenave-Ferré. Colocou-se 300 mL de água destilada nos matrizes do equipamento, em seguida foram adicionados 10 mL de hidromel no borbulhador, que foi então inserido nos matrizes, após a destilação, recolheram-se 100 mL do destilado. Na amostra destilada, foram adicionadas três gotas de fenolftaleína e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1N até que houvesse mudança de cor transparente para rosa, segundo (Pereira et al., 2013). O valor da acidez volátil foi expresso em g/L de ácido acético, obtido através da fórmula:

$$\text{Acidez volátil ácido acético (g/L)} = \text{volume de NaOH gasto (mL)} \times 0,6$$

4.5.13. Teor alcoólico (% v/v)

O título alcoométrico volúmico do hidromel foi determinado por ebulliometria, método recomendado pela OIV (1990). Iniciou-se com a medição da temperatura de ebulição da

água, que foi registada no disco do equipamento. De seguida, o hidromel foi colocado no equipamento para determinar a temperatura de ebulição. E por fim verificou-se no disco o teor alcoólico correspondente à temperatura lida, com os resultados expressos em percentagem de volume (% v/v), conforme descrito por Pereira et al. (2013).

4.5.14. Dióxido de enxofre total (SO₂)

A quantificação do dióxido de enxofre total (SO₂) no hidromel foi realizada seguindo o método de Ripper, descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 1990), baseada numa titulação iodométrica direta em meio ácido (Curvelo-Garcia, 1998)

Inicialmente, foram adicionados 25 mL de amostra de hidromel e 10 mL de solução de NaOH 1 N num almofariz de porcelana agitou-se a mistura e deixou-se repousar durante 5 minutos para estabilização. De seguida, foram incorporados 2,5 mL da solução de amido a 1% e 5 mL de ácido sulfúrico diluído (H₂SO₄ a 1/3). Titulou-se então com solução de iodo 0,02 N, até a coloração mudasse de laranja-claro para roxo-escuro, indicando o ponto final da reação, segundo Pereira et al., 2013. O resultado de SO₂ total foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} = \text{volume de solução de iodo utilizado (mL)} \times 25,6$$

4.5.15. Rendimento da fermentação

No processo de produção do hidromel, o rendimento da fermentação alcoólica foi calculado com o intuito de determinar o quanto dos açúcares disponíveis realmente se converteram em etanol.

$$Y_{\text{Etanol}}(\%) = \text{Etanol produzido (g/L)} / \text{Açúcares (g/L)}$$

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por meio de estatísticas descritivas e inferenciais com o objetivo de comparar os parâmetros de fermentação e a qualidade do hidromel produzido a partir de diferentes substratos. Para isso, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises foram realizadas com o apoio de diferentes softwares estatísticos: o SPSS, na sua versão gratuita para estudantes, utilizado para cálculos de ANOVA e geração de gráficos; o Microsoft Excel (versão 2019), empregado para organização dos dados, cálculos básicos e

construção de tabelas; e o R Studio (versão 4.4.2), software livre e de código aberto, utilizado para análises avançadas e visualização de dados. Essa abordagem integrada garantiu maior confiabilidade e robustez nos resultados, permitindo verificar diferenças significativas entre as bebidas fermentadas produzidos com diferentes substratos.

CAPÍTULO IV

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas realizadas às amostras de mel multifloral e melaço de cana-de-açúcar, bem como às bebidas fermentadas produzidas a partir destes substratos. As análises permitiram comparar o comportamento fermentativo e as características finais dos produtos obtidos com diferentes proporções de melaço, evidenciando semelhanças e diferenças entre as matérias-primas e as bebidas fermentadas resultantes.

A apresentação dos resultados encontra-se organizada em diferentes secções, abrangendo desde a caracterização inicial das matérias-primas até à avaliação do rendimento fermentativo, das propriedades físico-químicas e biológicas de bebidas fermentadas. Em cada etapa, os valores experimentais são comparados com dados disponíveis na literatura científica, permitindo validar os métodos utilizados e interpretar criticamente os resultados obtidos.

Assim, este capítulo procura relacionar os resultados experimentais com o enquadramento teórico previamente apresentado, destacando os principais contributos deste estudo para o entendimento do potencial do melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo e sustentável na produção de bebidas fermentadas.

5.1. Caracterização físico-química do mel e do melaço de cana-de-açúcar

5.1.1. pH, acidez livre e condutividade elétrica

Os resultados obtidos para o mel multifloral revelaram valores de pH ($3,57 \pm 0,07$), acidez livre ($28,5 \pm 0,70$ meq/kg) e condutividade elétrica ($0,44 \pm 0,02$ mS/cm) consistentes com os padrões descritos na literatura para méis de origem floral (Tabela 5).

Tabela 5: Análises químicas dos substratos.

Amostra	pH (\pm DP)	Acidez livre (meq/kg \pm DP)	Condutividade (mS/cm \pm DP)
Mel multifloral	$3,57 \pm 0,07^b$	$28,5 \pm 0,70^b$	$0,44 \pm 0,02^b$
Melaço de cana	$5,79 \pm 0,06^a$	$136,0 \pm 3,0^a$	$8,96 \pm 0,12^a$

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

De acordo com estudos realizados no Instituto Politécnico de Bragança (Gomes et al., 2010) o pH do mel situa-se geralmente entre 3,4 e 6,1, com média próxima de 3,9, refletindo a sua natureza intrinsecamente ácida. Esta característica contribui significativamente para a estabilidade microbiológica do mel, uma vez que o ambiente ácido inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis (Oroian & Ropciuc, 2017). A acidez livre observada situa-se consideravelmente abaixo do limite máximo de 50 meq/kg estabelecido pelo Codex Alimentarius (2001), confirmando a boa qualidade da amostra e a ausência de sinais de fermentação indesejada. Relativamente à condutividade elétrica, valores inferiores a 0,8 mS/cm são característicos de méis provenientes de néctar, enquanto méis de melada tendem a apresentar condutividades mais elevadas (Persano Oddo & Piro, 2004). O valor de 0,44 mS/cm determinado neste estudo enquadra-se, assim, no intervalo esperado para méis multiflorais, reforçando a autenticidade e a conformidade da amostra com o perfil botânico declarado.

Em contrapartida, o melaço de cana-de-açúcar apresentou um perfil físico-químico marcadamente distinto, com pH de $5,79 \pm 0,06$, acidez livre de $136,00 \pm 3,00$ meq/kg e condutividade elétrica de $8,96 \pm 0,12$ mS/cm. Estes resultados corroboram a elevada carga mineral e o carácter acidificante deste subproduto, conforme reportado por Palmonari et al. (2020b), que descrevem o melaço como uma matriz rica em minerais em formas altamente biodisponíveis. O pH mais elevado em comparação ao mel encontra-se em concordância com outros estudos que referem valores típicos entre 5,0 e 5,5 para o melaço (Palmonari et al., 2020b). A acidez livre acentuada pode ser atribuída à presença de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido aconítico e o ácido láctico frequentemente identificados constituintes predominantes no melaço (Kaur & Keshri, 2020). Do mesmo modo, a elevada condutividade elétrica observada confirma o alto teor de sais minerais, ultrapassando amplamente os valores registados para o mel e refletindo o elevado grau de mineralização característico desse subproduto (Jamir et al., 2021).

As diferenças observadas indicam que, enquanto o mel multifloral apresenta um perfil físico-químico estável e tradicionalmente adequado à produção de hidromel, o melaço de cana-de-açúcar surge como uma alternativa fermentativa promissora, embora tecnologicamente desafiante.

A sua composição complexa, marcada por elevada acidez livre, alta condutividade elétrica e abundância de minerais e compostos fenólicos, pode interferir no metabolismo das leveduras, afetando a assimilação de nutrientes e a produção de metabólitos voláteis

essenciais à qualidade sensorial (Jamir et al., 2021; Geremew Kassa et al., 2024; Laluce et al., 2016).

Essas particularidades justificam a necessidade de ajustes tecnológicos específicos durante o processo fermentativo, nomeadamente a correção do pH, a suplementação de azoto assimilável, o controlo de temperatura e oxigenação e a seleção de estirpes de levedura adaptadas às condições do melaço, a fim de melhorar a eficiência da fermentação e preservar a qualidade sensorial do produto final (Ungureanu, Vlăduț, & Biriș, 2022; Singh et al., 2020; Gomes et al., 2013).

Os dados obtidos neste estudo corroboram a literatura recente, que reconhece o potencial biotecnológico do melaço como substrato para a produção de bebidas fermentadas e bioetanol, desde que sejam aplicadas estratégias adequadas de otimização e controlo (Molina-Cortés et al., 2025; Laluce et al., 2016; Jamir et al., 2021). Deste modo, o melaço pode ser considerado uma matéria-prima sustentável e de elevado valor biológico, cuja valorização contribui para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar e a promoção de processos industriais mais circulares e ecológicos (Ungureanu et al., 2022; Geremew Kassa et al., 2024).

5.1.2. Humidade e cinzas totais

A humidade determinada do mel multifloral foi de $19,9 \% \pm 0,10$, e o teor de cinzas apresentou-se em $0,10 \% \pm 0,001$. Estes valores situam-se dentro dos limites regulamentares estabelecidos pelo Codex Alimentarius (CXS 12-1981) e pela Diretiva Europeia 2001/110/CE, que definem um valor máximo de 20% de humidade para maioria dos tipos de mel, admitindo-se exceções para algumas variedades especiais, como o mel de urze, cujo teor pode atingir 23% (Codex Alimentarius, 2001; European Commission, 2002).

A manutenção da humidade abaixo deste limite é essencial para garantir a estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial do produto, uma vez que teores superiores a 20 % favorecem o desenvolvimento de leveduras osmófilas e a consequente fermentação espontânea, comprometendo a qualidade e a conservação do mel. Diversos estudos indicam que o intervalo ideal de humidade para méis de elevada qualidade situa-se entre 16% e 18%, o que assegura maior estabilidade microbiológica e propriedades sensoriais mais consistentes (da Silva et al., 2016).

Relativamente ao teor de cinzas, o valor obtido ($0,09 \%$) é característico de méis de origem floral, os quais geralmente apresentam teores compreendidos entre $0,1 \%$ e $0,3 \%$,

raramente ultrapassando 0,6 % (Bogdanov et al., 2004; Saxena et al., 2010). O baixo conteúdo mineral confirma, assim, a natureza floral do mel analisado, em concordância com as descrições típicas de méis de elevada qualidade.

No caso do melaço de cana-de-açúcar, foram determinados uma humidade de $33,3\% \pm 0,24$ e um teor de cinzas totais de $4,8\% \pm 0,02$. Estes resultados enquadram-se nas faixas descritas pela FAO e em compilações técnicas, que reportam conteúdos de água entre 20% e 34,5 % e teores de cinzas entre 4,6% e 15,9% (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025).

De acordo com Geremew Kassa (2024), o melaço contém entre 75% e 85% de sólidos totais, o que implica um teor de humidade residual de 15–25%. Contudo, valores de humidade até aproximadamente 30% têm igualmente sido observados em determinados tipos industriais de melaço (Tabela 6).

Estudos efetuados por Palmonari et al. (2020a) corroboram que as variações no teor de cinzas podem refletir quer o tipo de melaço utilizado quer as diferenças nos processos tecnológicos de fabrico.

Tabela 6: Análises de humidade e teor de cinzas analisadas.

VARIÁVEL	Mel multifloral (média ± DP)	Melaço de cana-de-açúcar (média ± DP)	P-valor
Teor humidade (%)	$19,94 \pm 0,09^b$	$30,3 \pm 0,24^a$	< 0,001
Cinzas (%)	$0,097 \pm 0,02^b$	$4,8 \pm 0,02^a$	< 0,001
Teor matéria seca (%)	$80,07 \pm 0,12^a$	$69,67 \pm 0,23^b$	< 0,001

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Resumidamente, os resultados do teste de Tukey HSD mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre o mel e o melaço de cana-de-açúcar biológico para todas as variáveis analisadas. As amostras do melaço apresentaram maior teor de humidade e de cinzas, enquanto o mel mostrou maior teor de matéria seca.

5.1.3. Perfil mineral

A caracterização mineral dos substratos evidenciou contrastes marcados entre as duas amostras, refletindo não apenas as suas distintas origens botânicas e os diferentes processos tecnológicos de obtenção, mas também a respetiva composição nutricional.

No caso do mel multifloral, os resultados revelaram um perfil mineral moderado e equilibrado. O potássio destacou-se como o elemento predominante (0,17 g/100 g), seguido pelo cálcio (0,08 g/100 g), magnésio (0,02 g/100 g) e sódio (0,01 g/100 g). Os oligoelementos (ferro, manganês, cobre e zinco) foram detetados apenas em níveis vestigiais ($\leq 0,36$ mg/100 g). Estes resultados estão em plena concordância com a literatura internacional, que identifica o potássio como o principal mineral presente em méis europeus, representando entre 30% e 50% do total mineral, com valores médios compreendidos entre 1100 e 1600 mg/kg ($\approx 0,11$ – $0,16$ g/100 g), conforme referido por González-Miret et al. (2005), Escuredo et al. (2013) e Pohl et al. (2020). A presença residual de oligoelementos como Fe, Mn, Cu e Zn foi igualmente documentada em méis provenientes da Península Ibérica e de outras regiões temperadas, corroborando a consistência do perfil mineral observado no presente estudo.

Porém, o melaço de cana-de-açúcar evidenciou uma composição mineral significativamente mais elevada, fenómeno atribuído à concentração natural de nutrientes decorrente do processo de evaporação do caldo da cana. Os teores de potássio (1,54 g/100 g), cálcio (0,66 g/100 g) e magnésio (0,21 g/100 g) foram superiores aos observados no mel, caracterizando o melaço como uma matriz altamente mineralizada.

Para além destes macronutrientes minerais, os oligoelementos apresentaram-se em concentrações substancialmente superiores, com destaque para o ferro (~ 10 mg/100 g), manganês (3,46 mg/100 g), zinco (1,62 mg/100 g) e cobre (0,40 mg/100 g). Estes valores enquadram-se nas gamas reportadas na literatura para melaços de cana, que normalmente apresentam teores de ferro entre 8 e 15 mg/100 g e de manganês entre 2 e 5 mg/100 g (Rajan et al., 2019; Geremew Kassa, 2024). De forma consistente, os valores determinados neste estudo também se inserem nas faixas descritas para oligoelementos, com teores de ferro entre 2 e 25 mg/100 g, manganês entre 2 e 4 mg/100 g, cobre entre 0,3 e 0,8 mg/100 g e zinco entre 1 e 2 mg/100 g, conforme apresentado na Tabela 7.

As diferenças observadas entre os dois perfis minerais analisados refletem não apenas a natureza intrínseca das matérias-primas, mas também os efeitos dos respetivos métodos

de produção. Enquanto o mel é obtido a partir do néctar floral transformado pelas abelhas, preservando uma composição mais equilibrada e natural de minerais, o melaço resulta de um processo industrial concentrador, que promove o aumento substancial da densidade de sais minerais e açúcares.

De forma geral, os resultados confirmam que o mel multifloral apresenta um perfil mineral típico, equilibrado e consistente com o reportado para méis europeus, ao passo que o melaço de cana-de-açúcar se distingue pela sua elevada mineralização e pela concentração marcante de macro e micronutrientes.

Tabela 7: Comparação mineral entre os substratos usados na produção do hidromel.

Elemento	Unidade	Mel	Melaço de cana-de-açúcar	Referência típica (mel)	Referência típica (melaço)
K	g/100 g	0,17 ^b	1,54 ± 0,10 ^a	0,10–0,16 (≈1100–1570 mg/kg) (Escuredo et al., 2013; González-Miret et al., 2005; Pohl et al., 2020)	1,0–1,6 (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)
Na	g/100 g	0,01 ^b	0,08 ± 0,04 ^a	0,003–0,015 (Escuredo et al., 2013; Pohl et al., 2020)	0,05–0,10 (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)
Ca	g/100 g	0,08 ^b	0,66 ± 0,06 ^a	0,006–0,012 (60–120 mg/kg) (Escuredo et al., 2013)	0,5–1,2 (Palmonari et al., 2020b; Queensland Department of Primary Industries, 1975)
Mg	g/100 g	0,02 ^b	0,21 ± 0,01 ^a	0,003–0,008 (30–80 mg/kg) (Escuredo et al., 2013)	0,20–0,60 (Palmonari et al., 2020b)
Fe	mg/100 g	~0 (traços) ^b	10 ± 0 ^a	3–6 mg/kg (Escuredo et al., 2013)	2–25 mg/100 g (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)
Mn	mg/100 g	0,36 ^b	3,46 ± 0,20 ^a	0,2–2,0 (González-Miret et al., 2005)	2–4 (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)
Cu	mg/100 g	0,04 ^b	0,40 ± 0,02 ^a	0,05–0,7 (Escuredo et al., 2013)	0,3–0,8 (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)
Zn	mg/100 g	0,17 ^b	1,62 ± 0,07 ^a	0,1–0,5 (Escuredo et al., 2013; Pohl et al., 2020)	1–2 (Curtin, 1973; Palmonari et al., 2020b)

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.1.4. Atividade da água

A atividade da água (a_w) é um dos principais parâmetros físico-químicos envolvidos na determinação do potencial fermentativo de substratos. No presente estudo, os valores médios obtidos foram de $0,521 \pm 0,0025$ para o mel e $0,648 \pm 0,0010$ para o melaço, significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$). Estes resultados confirmam a maior disponibilidade de água livre no melaço, condição essencial para a viabilidade e desempenho das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica (Malomo et al., 2015).

O mel, por sua vez, é naturalmente caracterizado por uma baixa atividade da água, variando entre 0,50 e 0,60, o que o torna altamente resistente à contaminação microbiológica, mas também menos favorável à fermentação espontânea sem diluição prévia (Bogdanov et al., 2008). Esta baixa a_w inibe o crescimento de microrganismos não osmófilos, conferindo-lhe longa estabilidade, mas requer, no contexto da produção de hidromel, a adição de água ou correções nutricionais para viabilizar a ação das leveduras (Mendes-Ferreira et al., 2010).

Por outro lado, o melaço apresenta uma atividade da água (a_w) mais elevada, normalmente entre 0,60 e 0,75, o que favorece o desenvolvimento e a atividade metabólica dos microrganismos (Malomo et al., 2015). Além disso, o seu elevado teor em minerais e compostos azotados contribui para uma fermentação mais vigorosa e menos dependente de suplementações externas. De acordo com Mendes-Ferreira *et al.* (2010), a disponibilidade de nutrientes assimiláveis, especialmente de azoto, é um fator determinante na cinética fermentativa do hidromel, e o melaço distingue-se por ser um substrato naturalmente mais rico e equilibrado nesse aspeto.

Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o melaço de cana-de-açúcar apresenta vantagens em relação ao mel como substrato na produção de bebidas fermentadas (Tabela 8), sobretudo devido à sua atividade de água mais elevada e ao seu teor nutricional mais rico. A presença de compostos azotados, minerais e vitaminas no melaço cria condições mais favoráveis ao crescimento e ao metabolismo das leveduras, conduzindo a fermentações mais rápidas, completas e eficientes (Mendes-Ferreira et al., 2010). Além disso, a maior disponibilidade de água livre favorece a viabilidade celular e contribui para um controlo microbiológico mais eficaz durante o processo fermentativo (Malomo et al., 2015).

Tabela 8: Atividade da água das matrizes.

Matriz	a_w (média \pm DP)	Valor de p (anova)
Mel multifloral	$0,52 \pm 0,003^b$	Anova: $p < 0,001$
Melaço de cana-de-açúcar	$0,65 \pm 0,001^a$	Anova: $p < 0,001$

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O teste ANOVA seguido de Tukey HSD mostrou que a atividade de água (a_w) difere de forma estatisticamente significativa entre o mel multifloral e o melaço de cana-de-açúcar. O melaço apresentou a_w significativamente mais elevado ($0,65 \pm 0,001^a$) do que o mel ($0,52 \pm 0,003^b$); a diferença média (melaço menos mel) foi de 0,13 (IC ajustado Tukey: 0,12–0,13; p -ajustado $< 0,001$), isto significa que o melaço tem muito mais água livre disponível do que o mel, o que pode influenciar estabilidade microbiológica e propriedades físico-químicas.

5.1.5. Teor de açúcares

A análise do teor de açúcares dos substratos melaço de cana-de-açúcar e o mel multifloral apresentaram diferenças relevantes, com impacto direto no seu potencial como substratos fermentáveis. O mel apresentou, como esperado, teores bastante elevados de frutose (38,00 g/100 g) e glicose (31,00 g/100 g), ambos açúcares simples que são rapidamente metabolizados por leveduras. No caso do melaço, os valores desses dois açúcares foram mais baixos (frutose: 4,58 g/100 g; glicose: 3,03 g/100 g), mas compensados por uma concentração expressiva de sacarose (36,33 g/100 g), significativamente superior ao valor observado no mel (1,90 g/100 g), conforme apresentada na Figura 9.

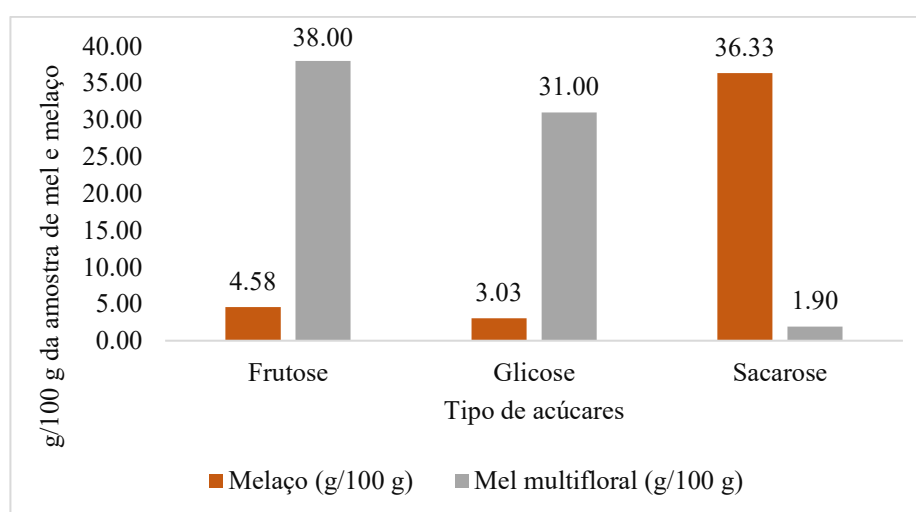


Figura 9: Valores dos açúcares presentes no mel e melaço de cana-de-açúcar.

Embora o melaço apresente uma proporção inferior de monossacarídeos em comparação com o mel, a sua elevada concentração de sacarose não constitui necessariamente uma limitação ao processo fermentativo. As leveduras do género *Saccharomyces*, amplamente utilizadas na produção de hidromel e noutras bebidas fermentadas, possuem a capacidade de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose por ação da enzima invertase (β -frutofuranosidase) (Fleet, 2003). Esta enzima, codificada pelo gene SUC2 e localizada na parede celular, permite a rápida disponibilização de açúcares fermentáveis nas fases iniciais da fermentação, assegurando a eficiência do processo mesmo em substratos com baixo teor de monossacarídeos livres.

Apesar desta capacidade adaptativa, o uso do melaço como substrato apresenta desafios específicos devido à sua composição complexa. Para além dos açúcares fermentáveis, o melaço contém quantidades consideráveis de sais minerais (como cálcio, potássio, magnésio e ferro), compostos fenólicos e produtos de Maillard, que podem afetar negativamente o crescimento celular e a atividade enzimática das leveduras (Amorim & Lopes, 2019). A sua elevada viscosidade e pressão osmótica podem igualmente dificultar a transferência de oxigénio e nutrientes, prolongando a fase de latência e reduzindo a velocidade de fermentação. Assim, a eficiência fermentativa depende de fatores como o pH inicial, o arejamento controlado, a concentração de sólidos solúveis e a adaptação prévia das leveduras ao meio.

O melaço distingue-se ainda pelo baixo custo e pela elevada disponibilidade industrial, características que o tornam especialmente atrativo para processos fermentativos em maior escala (Gomes et al., 2018). O seu perfil nutricional rico em micronutrientes (nomeadamente potássio, cálcio e magnésio) pode favorecer a atividade das leveduras, representando uma vantagem face ao mel, que, apesar de conter açúcares facilmente fermentáveis, apresenta um baixo teor de azoto assimilável e, por isso, requer frequentemente suplementação externa para assegurar uma fermentação equilibrada (Mendes-Ferreira et al., 2010).

Adicionalmente, técnicas de pré-tratamento, como o aquecimento ou a acidificação, podem ser aplicadas para promover a hidrólise parcial da sacarose, aumentando a disponibilidade imediata de açúcares fermentáveis e acelerando o processo (Pereira et al., 2021).

Em síntese, o melaço de cana-de-açúcar revela-se um substrato alternativo viável e sustentável para a produção de hidromel, desde que sejam implementadas estratégias adequadas de controlo e otimização do processo fermentativo, permitindo conciliar viabilidade económica, eficiência tecnológica e qualidade sensorial do produto final. Para além do seu papel como fonte de açúcares e minerais, o melaço apresenta uma composição rica em compostos bioativos, cuja contribuição para a estabilidade oxidativa e o valor funcional do hidromel é particularmente relevante, conforme descrito na secção seguinte.

5.2. Análise do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante

O melaço de cana-de-açúcar apresentou valores superiores de compostos fenólicos totais ($9,20 \pm 0,11$ mg eq. ácido gálico/g) e flavonoides totais ($0,63 \pm 0,01$ mg eq. quercetina/g) em comparação com o mel ($0,20 \pm 0,001$ mg eq. AG/g e $0,03 \pm 0,001$ mg eq. Q/g) (Tabela 9). Paralelamente, observaram-se valores mais elevados de capacidade antioxidante no melaço, tanto no ensaio FRAP ($2,97 \pm 0,08$ mg eq. Fe^{2+} /g) como no DPPH ($4,94 \pm 0,01$ mg eq. Trolox/g).

Estes resultados são coerentes com estudos prévios que atribuem a elevada bioatividade do melaço à presença de melanoidinas, compostos fenólicos e produtos da reação de Maillard, formados durante o processamento térmico do caldo da cana (Palmonari et al., 2020c; Martins et al., 2018; Chung et al., 2021).

O mel, por sua vez, apresentou teores fenólicos inferiores, embora contenha ácidos fenólicos leves e flavonoides simples, que também contribuem para a sua capacidade antioxidante (Gomes et al., 2013).

Assim, a substituição parcial ou total do mel por melaço em mostos fermentáveis poderá incrementar o potencial antioxidante do hidromel, promovendo maior estabilidade oxidativa e valor funcional superior no produto final.

De forma complementar, a elevada riqueza mineral e o conteúdo fenólico expressivo do melaço reforçam o seu potencial como substrato multifuncional, combinando valor nutricional, bioatividade e aptidão fermentativa, características que o distinguem do mel e que poderão refletir-se positivamente na qualidade global e estabilidade do hidromel obtido.

Tabela 9: Potencial bioativo: compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante.

Amostras	Fenóis (mg eq. AG/g)	Flavonoides (mg eq. Q/g)	FRAP (mg eq. Fe ²⁺ /g)	DPPH (mg eq. Trolox/g)	Valor de p (anova)
Mel multifloral	0,20 ± 0,001 ^b	0,03 ± 0,001 ^b	0,38 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,002 ^b	P < 0,001
Melaço de cana-de-açúcar	9,20 ± 0,11 ^a	0,63 ± 0,01 ^a	2,97 ± 0,08 ^a	4,94 ± 0,01 ^a	P < 0,001

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

O melaço de cana-de-açúcar apresenta potencial antioxidante muito superior ao mel multifloral em todos os parâmetros testados, tornando-o uma excelente opção como substrato rico em compostos fenólicos e flavonoides.

5.3. Análises microbiológicas

A contaminação microbiana em substratos açucarados pode comprometer a viabilidade das leveduras inoculadas e afetar o rendimento e qualidade final do hidromel, através da produção de metabólitos indesejáveis ou da competição por nutrientes. Para tal, foram determinados os principais indicadores de qualidade microbiológica, nomeadamente a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, e bactérias esporuladas e formadoras de ácido láctico. Estes parâmetros permitem avaliar a condição higiénica geral dos substratos e identificar potenciais riscos de alteração microbiológica durante a fermentação.

A Tabela 10 apresenta os resultados da análise microbiológica dos dois substratos estudados, o melaço de cana-de-açúcar e mel multifloral — expressos em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). Foram avaliados quatro parâmetros microbiológicos principais: a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos (PCA), os coliformes totais e *Escherichia coli* (como indicadores de contaminação fecal, segundo a norma ISO 21528-2:2017), a presença de *Bacillus cereus* e a contagem de bolores e leveduras. Estes parâmetros permitem avaliar tanto a qualidade higiénico-sanitária das matérias-primas como o seu potencial de conservação e adequação para processos fermentativos, como é o caso da produção de hidromel.

No que respeita à contagem total de microrganismos em meio PCA, o melaço apresentou um valor de $8,82 \times 10^2$ UFC/mL, enquanto o mel multifloral registou uma contagem inferior ao limite de deteção, <10 UFC/mL.

Para coliformes totais e *E. coli*, ambos os substratos apresentaram valores <1 UFC/mL, não sendo detetada a presença destes microrganismos indicadores de contaminação fecal. Em relação a *Bacillus cereus*, os resultados foram igualmente baixos, com valores <10 UFC/mL tanto para o melaço como para o mel multifloral, sugerindo ausência deste microrganismo esporulado.

Finalmente, as contagens de bolores e leveduras revelaram-se também reduzidas, com valores <10 UFC/mL para ambos os substratos.

Tabela 10: Análises microbiológicas dos substratos.

Amostras	UFC/mL			
	Mesófilos totais	Coliformes/ <i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	Bolores/ leveduras
Melaço	$8,82 \times 10^2$	<1	<10	<10
Mel multifloral	<10	<1	<10	<10

De forma geral, ambos os substratos apresentaram baixa carga microbiana, sem deteção de microrganismos patogénicos, de flora deteriorante ou de indicadores de contaminação fecal em níveis preocupantes. O mel multifloral destacou-se por apresentar valores inferiores ao limite de deteção (<10 UFC/mL) em todos os parâmetros analisados. Estes resultados confirmam o seu carácter microbiologicamente estável, o que se deve à sua baixa atividade de água ($a_w < 0,6$) e à presença de compostos com ação antimicrobiana, como o peróxido de hidrogénio, os ácidos orgânicos e os polifenóis (Mandal & Mandal, 2011).

A estabilidade do mel é amplamente reconhecida na literatura. Estudos da FAO/WHO (2020) e da *European Commission* (Comissão Europeia) (2022) indicam que os méis de boa qualidade apresentam contagens de microrganismos mesófilos inferiores a 10^2 UFC/g e valores de bolores e leveduras geralmente abaixo de 10^1 UFC/g, devido à sua baixa atividade de água e composição rica em açúcares redutores. Esta composição limita a disponibilidade de água livre e inibe o crescimento microbiano, o que explica os baixos valores obtidos no presente estudo.

Além disso, o mel contém compostos naturalmente antimicrobianos, como enzimas oxidativas e compostos fenólicos, que contribuem não só para a sua estabilidade microbiológica, mas também para o perfil sensorial e bioativo do produto (Mandal & Mandal, 2011). Estas propriedades conferem ao mel uma vantagem natural enquanto

substrato para fermentações alcoólicas, reduzindo o risco de contaminações durante a fase inicial e assegurando maior previsibilidade no processo fermentativo do hidromel.

O melaço de cana-de-açúcar, por sua vez, apresentou uma contagem total de microrganismos de $8,82 \times 10^2$ UFC/mL, ligeiramente superior à do mel, mas ainda dentro das faixas reportadas para melaços comerciais (Dantas et al., 2022). Estes valores situam-se entre os 10^3 e 10^4 UFC/g normalmente registados para produtos de melaço armazenados em condições controladas (Keça et al., 2022), demonstrando que o material analisado se encontra dentro de padrões aceitáveis.

A diferença entre o melaço e o mel multifloral pode ser atribuída à maior humidade do melaço ($a_w \approx 0,65$) e à abundância de nutrientes assimiláveis, fatores que favorecem a sobrevivência de microflora ambiental, como bactérias esporuladas e leveduras osmofílicas. Apesar disso, a ausência de coliformes totais e *E. coli* (<1 UFC/mL) demonstra boas condições de higiene e processamento, o que está em conformidade com os critérios da ISO 21528-2:2017, que define os limites e métodos de deteção de Enterobacteriaceae em produtos alimentares.

Relativamente a *Bacillus cereus*, registaram-se valores <10 UFC/mL para ambos os substratos, indicando ausência prática deste microrganismo esporulado. A presença de *B. cereus* é comum em produtos de origem vegetal, mas os níveis obtidos são significativamente inferiores aos reportados em alguns estudos com méis de diferentes origens geográficas, onde as contagens variam entre 10^1 e 10^3 UFC/g (Luca et al., 2025). Este resultado confirma a boa qualidade sanitária tanto do melaço como do mel multifloral e a ausência de riscos toxigénicos relevantes.

As contagens de bolores e leveduras foram igualmente inferiores a 10 UFC/mL em ambas as amostras, comprovando a estabilidade microbiológica e a ausência de flora deteriorante. Segundo (Luca et al., 2025), contagens superiores (10^2 – 10^3 UFC/g) são geralmente associadas a armazenamento inadequado ou a humidade excessiva. Assim, os valores obtidos neste estudo demonstram que ambos os substratos foram devidamente acondicionados e apresentam as condições ideais para fermentação controlada.

De forma geral, os resultados obtidos demonstram que tanto o mel multifloral como o melaço exibiram níveis microbianos baixos, compatíveis com as especificações internacionais para matérias-primas destinadas a processos fermentativos (FAO/WHO, 2020; European Commission, 2022; ISO 21528-2:2017). O mel multifloral, pela sua composição e propriedades intrínsecas, é naturalmente mais estável e menos suscetível a contaminações. O melaço, embora apresente uma flora ligeiramente superior, mantém-se

dentro de limites aceitáveis e pode ser utilizado como substrato fermentável, desde que submetido a tratamento térmico prévio, por exemplo, pasteurização a 60–70°C durante 15–30 minutos de modo a garantir a inativação microbiana e a preservação da estabilidade do mosto (Dantas et al.,2022).

Em síntese, conclui-se que ambos os substratos apresentam qualidade microbiológica adequada para a produção de bebidas fermentadas. O mel multifloral destaca-se pela sua estabilidade natural e segurança intrínseca, sendo ideal como base principal do mosto, enquanto o melaço, embora apresente uma carga microbiana ligeiramente mais elevada, é igualmente viável desde que sejam asseguradas boas práticas de higienização e armazenamento. Assim, tanto o mel multifloral como o melaço de cana-de-açúcar podem ser considerados matérias-primas seguras e tecnicamente adequadas para o processo fermentativo de produção de bebidas fermentadas, garantindo a qualidade, segurança e reprodutibilidade do produto final.

5.4. Caracterização físico-química e microbiológica do mosto e do produto final

5.4.1. Análise da cinética de crescimento microbiano durante a fermentação

A avaliação da cinética de crescimento microbiano nas três formulações de mosto A (100% mel), B (50% mel + 50% melaço) e C (100% melaço) permitiu compreender de que forma as características físico-químicas dos substratos influenciam a dinâmica fermentativa, mesmo quando se assegura suplementação nutricional adequada. A análise das curvas de crescimento, expressas em logaritmo natural da densidade ótica ($\ln(DO)$), revelou início imediato da fase exponencial em todos os mostos, com aumento acentuado da biomassa nas primeiras 24 horas (Figura 10). Este comportamento é compatível com a inoculação de leveduras previamente hidratadas e metabolicamente ativas, bem como com a presença de nutrientes essenciais resultante da suplementação com fontes comerciais de azoto e micronutrientes.

Após a fase exponencial, observou-se uma estabilização das curvas, característica da fase estacionária do crescimento, durante a qual a taxa de multiplicação celular diminui devido à exaustão dos açúcares fermentescíveis e à acumulação de produtos secundários, como etanol e ácidos orgânicos. A manutenção dos valores de $\ln(DO)$ ao longo do tempo sugere que, apesar da interrupção do crescimento ativo, a viabilidade das células foi preservada até ao final do processo.

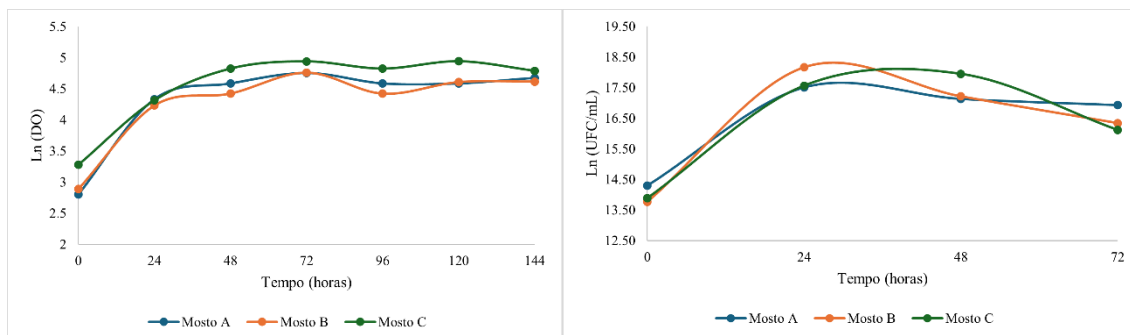


Figura 10: Resultados da densidade ótica e curva de crescimento microbiano durante a fermentação.

Em termos quantitativos, os dados obtidos evidenciam diferenças claras entre as formulações. O mosto B, constituído por uma mistura em partes iguais de mel e melaço, apresentou a taxa específica de crescimento mais elevada ($\mu_c = 0,183 \text{ h}^{-1}$), bem como o menor tempo de duplicação ($TD = 3,79 \text{ h}$), o que reflete uma dinâmica de multiplicação celular rápida e eficiente. A biomassa final atingida foi de 4,76, muito próxima da registada nos restantes mostos. O mosto A (100% mel) apresentou taxa de crescimento mais baixa ($\mu_c = 0,134 \text{ h}^{-1}$) e tempo de duplicação mais longo ($TD = 5,19 \text{ h}$), com biomassa final de 4,75. Por sua vez, o mosto C (100% melaço) apresentou uma taxa de crescimento idêntica ao mosto A ($\mu_c = 0,134 \text{ h}^{-1}$; $TD = 5,17 \text{ h}$), mas registou a biomassa final mais elevada de todas (4,94), o que evidencia maior rendimento acumulado ao longo da fermentação,

Como todos os mostos foram suplementados com nutrientes comerciais, não se pode atribuir estas diferenças a limitações em azoto ou outros fatores nutricionais essenciais. A explicação deverá, por isso, centrar-se em fatores físico-químicos intrínsecos aos substratos. O mel é naturalmente rico em açúcares simples, como glicose e frutose, de assimilação rápida pelas leveduras, o que justifica o arranque célere da fermentação observado nos mostos A e B. No entanto, o mel apresenta também uma pressão osmótica elevada, resultado da sua elevada concentração de açúcares redutores, o que pode causar stress osmótico nas células e limitar o crescimento celular em fases mais avançadas da fermentação. Além disso, possui uma capacidade tampão reduzida e um perfil mineral relativamente pobre, o que pode condicionar o metabolismo das leveduras durante a fase estacionária, mesmo com suplementação nutricional adequada.

O melaço, por sua vez, contém predominantemente sacarose, um dissacárido que requer hidrólise enzimática prévia antes de ser metabolizado pelas leveduras. Este passo

adicional pode justificar o crescimento ligeiramente mais lento observado nos mostos C, sobretudo nas fases iniciais. No entanto, o melaço compensa esta limitação com uma matriz nutricional mais diversificada, rica em compostos fenólicos, minerais, azoto orgânico e substâncias com efeito tampão, que favorecem a estabilidade metabólica ao longo de todo o processo. Estes fatores explicam a biomassa final mais elevada obtida no mosto C, apesar da sua taxa de crescimento específica mais baixa. Os parâmetros μ_c (taxa específica de crescimento), TD (tempo de duplicação) e BF (biomassa final) obtidos para cada mosto constam da Tabela 11, refletindo a dinâmica cinética e o desempenho metabólico ao longo da fermentação.

Tabela 11: Parâmetros de crescimento.

Mostos	μ_c	TD	BF
A	0,134	5,19	4,75
B	0,183	3,79	4,76
C	0,134	5,17	4,94

μ_c - Taxa específica de crescimento; TD-Tempo de duplicação; BF- Biomassa final.

A combinação de mel e melaço, utilizada no mosto B, parece oferecer um equilíbrio vantajoso entre as características de ambos os substratos. Os açúcares simples do mel permitem um crescimento inicial rápido, enquanto os compostos estruturantes e estabilizadores do melaço sustentam o crescimento posterior. Este efeito sinérgico pode justificar a taxa específica de crescimento superior observada no mosto B ($\mu_c = 0,183$). Estes resultados estão de acordo com a literatura recente, que demonstra que, mesmo em meios com suplementação nutricional adequada, o comportamento fermentativo das leveduras é fortemente influenciado por fatores físico-químicos como viscosidade, pH, pressão osmótica, composição açucarada e presença de compostos de Maillard (Silva et al., 2021; Eliodório et al., 2023; Gutiérrez et al., 2022). Além disso, estudos recentes mostram que o metabolismo de *S. cerevisiae* é regulado por vias de sinalização que respondem ao stress osmótico e ao etanol, afectando tanto a taxa de crescimento como a capacidade de adaptação ao meio (González et al., 2021; Chatzitheodoridou, 2024).

h^{-1}), sem prejuízo da viabilidade celular a longo prazo. Embora a biomassa final não tenha sido significativamente superior às restantes, a maior velocidade de crescimento representa uma vantagem tecnológica relevante, especialmente em processos de fermentação com restrições temporais.

Em termos gerais, a composição físico-química do substrato revelou-se determinante para o comportamento fermentativo observado. A substituição parcial ou total do mel pelo melaço não comprometeu a viabilidade nem a eficiência do processo. Pelo contrário, o uso do melaço, quer isoladamente, quer em combinação com o mel, demonstrou potencial para melhorar a produtividade e a estabilidade da fermentação. Estes resultados reforçam a viabilidade da incorporação de melaço em formulações destinadas à produção de bebidas fermentadas, contribuindo não só para a otimização do processo, mas também para a valorização de subprodutos agroindustriais com elevado valor biotecnológico.

5.4.2. Azoto assimilável

Após a adição de 0,60 g/L do nutriente comercial, observou-se um aumento considerável do azoto assimilável (YAN) nas três formulações de mosto, conforme apresentado na Figura 11. Esta suplementação teve como objetivo garantir condições adequadas à fermentação alcoólica, uma vez que o YAN é um dos principais fatores limitantes do crescimento e metabolismo das leveduras (*S. cerevisiae*) em matrizes pobres em azoto. A suplementação resultou em valores entre 140–250 mg N/L, ultrapassando o limiar mínimo de 140 mg N/L recomendado para fermentações completas em condições anaeróbias (Christofi et al., 2022; Gobert et al., 2019).

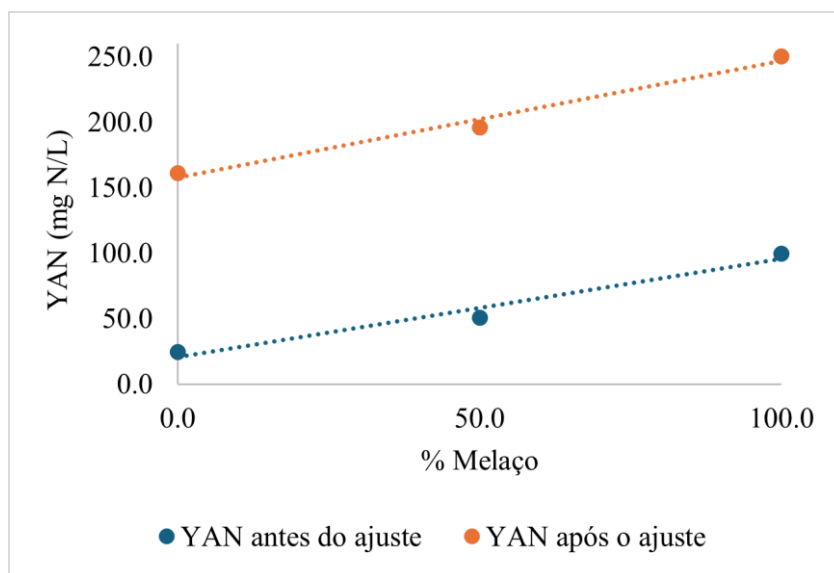


Figura 11: Azoto assimilável antes e após o ajuste nos mostos.

O mosto A (100% mel), que inicialmente apresentava níveis de YAN muito reduzidos, alcançou cerca de 160 mg N/L após a correção, evidenciando um aumento significativo.

Este resultado confirma que o mel, apesar de rico em açúcares, é uma matriz naturalmente pobre em azoto disponível, com grande variabilidade consoante origem floral e o processamento. A ausência de azoto suficiente pode levar à paragem prematura da fermentação, baixa produção de etanol e aumento da produção de compostos indesejáveis (como H₂S), sendo por isso necessária a suplementação para garantir o desempenho das leveduras (Pereira et al., 2015).

No caso do mosto B (50% mel + 50% melaço), os valores de YAN após o ajuste situaram-se ligeiramente acima de A, na ordem dos 170–180 mg N/L. Esta diferença deve-se à contribuição do melaço, que contém naturalmente maior quantidade de compostos azotados e minerais do que o mel, como reportado por Fadel et al. (2013). No entanto, é importante notar que, apesar desta riqueza aparente, a biodisponibilidade real do azoto no melaço pode variar significativamente entre lotes, devido à natureza do processo industrial de produção e à presença de compostos complexos ou inibidores.

A formulação C (100% melaço) atingiu o valor mais elevado de YAN após suplementação, com cerca de 250 mg N/L, o que reflete não só o azoto adicionado, mas também o conteúdo azotado naturalmente presente no substrato. Este valor indica que o melaço não só permite atingir rapidamente níveis adequados de azoto para fermentação, como também fornece uma reserva adicional, o que pode ser benéfico para processos de fermentação mais longos ou com elevadas concentrações de açúcar.

Estes dados evidenciam que o ajuste do YAN é um passo imprescindível para garantir uma fermentação robusta, especialmente em substratos com composição variável ou naturalmente pobre em azoto. Estudos recentes confirmam que valores inferiores a 140 mg N/L comprometem o crescimento celular, a síntese de biomassa e a produção de etanol, sendo frequente a ocorrência de fermentações incompletas em mostos não ajustados (Christofi et al., 2022; Gobert et al., 2019).

A análise dos valores de azoto residual após a fermentação (Figura 12) fornece uma perspetiva complementar sobre a utilização de YAN pelas leveduras. Observa-se uma tendência crescente no conteúdo de azoto residual com o aumento da proporção de melaço nas formulações: o hidromel A (100% mel) apresentou um valor residual muito reduzido, cerca de ± 12 mg N/L, o que indica uma depleção quase total do azoto disponível. Este esgotamento está associado à limitação do substrato e demonstra que, sem suplementação, a fermentação teria sido comprometida. Na bebida B (mistura) apresentou um valor intermédio, na ordem dos ± 56 mg N/L, o que demonstra que a

levedura consumiu a maior parte do azoto disponível, mas que existiu uma pequena margem residual, suficiente para sustentar a fermentação até ao final. Já na bebida C (100% melaço) apresentou o valor residual mais elevado, cerca de ± 86 mg N/L, confirmando que parte do azoto permaneceu disponível após a conclusão da fermentação, o que poderá estar associado à oferta excedente ou à menor utilização de certos compostos azotados não preferenciais pelas leveduras.

Esta tendência crescente, $A < B < C$ reflete a relação direta entre a matriz do substrato e a retenção/utilização do azoto durante a fermentação. Enquanto o mel exige correção rigorosa e precisa, o melaço oferece maior segurança operacional, ainda que, como referido, o azoto presente nem sempre seja de assimilação imediata. Fadel et al., (2013) destacam, neste sentido, que a composição do melaço pode incluir compostos complexos, como peptídeos ou compostos fenólicos, que, embora contribuam para o YAN total, não são utilizados eficientemente pelas leveduras.

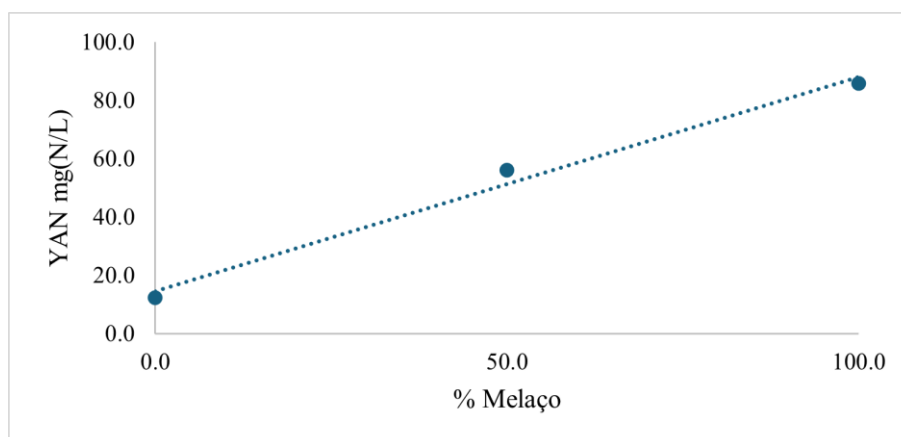


Figura 12: Azoto assimilável após a fermentação.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram, por conseguinte, a importância de ajustar o YAN consoante a matriz utilizada, tendo em consideração não apenas a quantidade de azoto, mas a sua qualidade e biodisponibilidade. Este ajustamento é particularmente crítico em fermentações com mel, mas continua a ser relevante em formulações com melaço, dado que a composição natural do substrato pode ser insuficiente ou variável.

Além disso, a presença de azoto residual nas formulações B e C pode ter implicações positivas para a qualidade final do produto, uma vez que evita a libertação de compostos de stress (como compostos sulfurosos), melhora a síntese de biomassa e assegura uma fermentação mais estável e previsível. Segundo Pereira et al. (2015), o controlo adequado

do YAN não só assegura a fermentação alcoólica completa, como também contribui para a formação equilibrada dos aromas e para a redução de defeitos sensoriais.

5.4.3. Açúcares redutores

A composição inicial dos mostos revelou perfis de açúcares bastante distintos entre as formulações, de acordo com os dados apresentados na Tabela 12 e na Figura 13. O mosto A (100% mel) apresentou um teor de açúcares totais de $198,6 \pm 3,3$ g/L, dos quais $192,2 \pm 4,3$ g/L ($\approx 96\%$) correspondem a açúcares redutores, essencialmente glicose e frutose, os principais monossacáridos presentes no mel. Este resultado está de acordo com o perfil já bem descrito para mel multifloral utilizado na produção de hidromel, no qual os açúcares redutores dominam a composição sacarídea (Webster et al., 2025).

Tabela 12: Análise dos açúcares determinada pela metodologia DNS.

Mostos	Açúcares totais	Açúcares redutores
A	$198,6 \pm 3,3^a$	$192,2 \pm 4,3^a$
B	$177,2 \pm 0,7^b$	$142,4 \pm 0,6^b$
C	$177,7 \pm 3,9^b$	$52,2 \pm 1,6^c$

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A adição de melaço no mosto B (50% mel e 50% melaço) conduziu a uma diminuição dos açúcares redutores para $142,4 \pm 0,6$ g/L ($\approx 80\%$). Esta redução é explicada pela substituição parcial do mel por melaço, um substrato rico em sacarose, mas com menor teor de açúcares redutores, conforme reportado em diversos estudos (Fadel et al., 2013; Eliodório et al., 2023). O mosto C (100% melaço) evidenciou a composição mais distinta, com $52,2 \pm 1,6$ g/L de açúcares redutores, o que representa apenas cerca de 30% dos açúcares totais ($177,7 \pm 3,9$ g/L). Estes resultados revelam uma reversão do perfil de açúcares em comparação com o mosto A, sendo a sacarose o açúcar predominante no melaço ($\approx 70\%$), o que está de acordo com a literatura sobre a composição química deste subproduto agroindustrial (Silva et al., 2021).

Durante o processo fermentativo, observou-se uma redução gradual dos açúcares redutores em todas as formulações, conforme ilustrado na Figura 13. No entanto, a velocidade e extensão da depleção variaram consoante a composição do mosto. No mosto A, a redução foi mais lenta e incompleta, o que pode ser atribuído à menor densidade nutricional do mel, mesmo após suplementação, o que pode ter afetado a atividade fermentativa das leveduras. Por contraste, nos mostos B e C a redução dos açúcares redutores foi mais rápida e eficiente, o que reflete uma maior disponibilidade de nutrientes essenciais à fermentação, bem como um perfil de açúcares mais favorável ao metabolismo de *S. cerevisiae*.

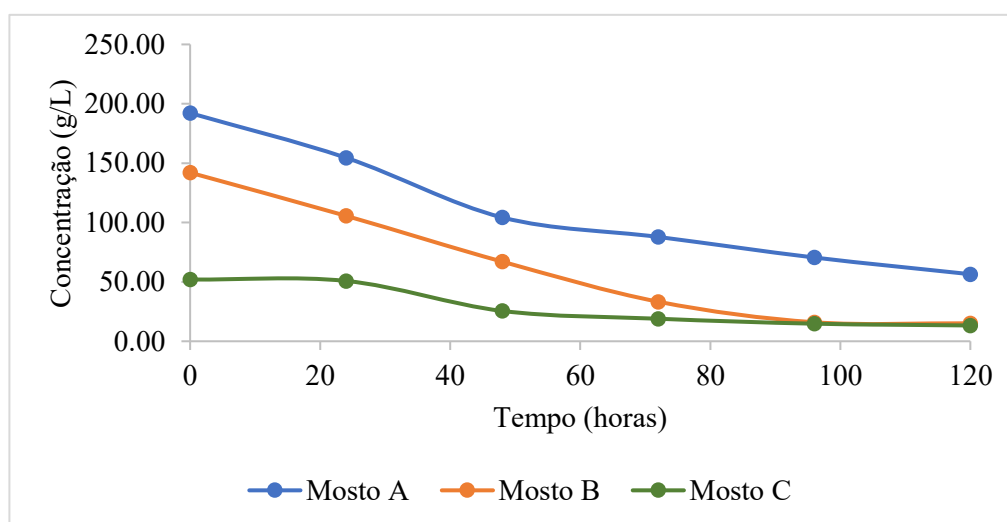


Figura 13: Consumo de açúcares redutores durante a fermentação das bebidas fermentadas.

A análise dos açúcares residuais no final da fermentação, obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e apresentada na Tabela 13, confirma estas observações. A glicose foi praticamente esgotada nos mostos B e C, encontrando-se abaixo do limite de quantificação (LOQ). Por outro lado, no mosto A, ainda se verificaram $9,96 \pm 0,38$ g/L de glicose, indicando uma fermentação incompleta, possivelmente devido à limitação na assimilação de certos nutrientes, à presença de compostos inibitórios naturais no mel, ou à menor eficiência metabólica em ambientes de elevada osmolaridade (Ciani et al., 2016). A frutose, por sua vez, apresentou valores residuais de $13,77 \pm 0,52$ g/L em A, $0,79 \pm 0,07$ g/L em B, e $1,14 \pm 0,09$ g/L em C, evidenciando a cinética preferencial de consumo da glicose antes da frutose, fenómeno conhecido como glucofilia, típico de *S. cerevisiae* (Tronchoni et al., 2009; Bely et al., 2003). A baixa frutose residual nos mostos B e C está associada à sua fermentação ativa e completa, enquanto o teor mais elevado em A confirma a limitação já referida.

A sacarose residual foi também distinta entre as formulações. No mosto A, o valor foi de $11,57 \pm 0,41$ g/L, em B foi de $7,45 \pm 0,28$ g/L, e em C foi inferior ao limite de quantificação, indicando hidrólise e fermentação eficazes nesta última formulação. A ausência de sacarose residual em C é coerente com a presença de invertase, que converte rapidamente a sacarose em glicose e frutose, e com uma fermentação eficaz posterior destes monossacáridos (Novo et al., 2021).

Por fim, o glicerol, subproduto da fermentação alcoólica e marcador secundário do stress osmótico e redox, foi inferior ao limite de quantificação (<LOQ) em todas as formulações, o que indica fermentações controladas e sem sinais de stresse metabólico acentuado. Este resultado é desejável em bebidas fermentadas como o hidromel, onde teores elevados de glicerol podem comprometer a percepção sensorial do produto final.

Em síntese, os dados obtidos confirmam que a composição inicial dos substratos afeta diretamente a cinética de fermentação, a utilização dos açúcares e o rendimento alcoólico final. O mel, embora rico em açúcares redutores, limita-se em termos de composição nutricional. Já o melaço, apesar de conter mais sacarose, favorece a fermentação quando bem suplementado. A combinação de ambos (mosto B) parece representar um equilíbrio ótimo entre açúcares fermentescíveis e suporte nutricional, permitindo fermentação eficiente.

Tabela 13: Concentração dos açúcares finais determinados pelo HPLC.

Bebida fermentada	Sacarose (g/l)	Frutose (g/l)	Glicose (g/l)	Etanol (% v/v)	Glicerol (g/l)
A	$11,57 \pm 0,41^a$	$13,77 \pm 0,52^a$	$9,96 \pm 0,38^a$	$10,30 \pm 0,22^b$	<LOQ
B	$7,45 \pm 0,28^b$	$0,79 \pm 0,07^c$	<LOQ	$10,84 \pm 0,19^a$	<LOQ
C	<LOQ	$1,14 \pm 0,09^b$	<LOQ	$9,35 \pm 0,25^c$	<LOQ

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.4.4. Acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total (SO₂)

A análise da acidez total final das bebidas fermentadas revelou um gradiente crescente associado à composição do substrato, com valores de $5,44 \pm 0,16$ g/L na bebida fermentada A (100% mel), $9,68 \pm 0,21$ g/L em B (50% mel / 50% melaço) e $13,8 \pm 0,10$ g/L na bebida C (100% melaço) (Tabela 14). Estes resultados indicam que a incorporação

progressiva de melação tem um efeito direto no aumento da acidez total, o que pode ser justificado por várias características físico-químicas desta matriz.

Em primeiro lugar, o valor registado no hidromel A está de acordo com a faixa normalmente descrita para hidroméis tradicionais, geralmente situada entre 4 e 7 g/L (Gomes et al., 2013; Webster et al., 2025). Esta acidez moderada é atribuída à produção de ácidos orgânicos primários (como o ácido succínico e láctico) durante a fermentação de mostos de mel, cuja composição é pobre em compostos precursores de acidificação.

No entanto, à medida que o melação é introduzido na formulação (mostos B e C), os valores de acidez aumentam significativamente. A bebida B apresenta uma acidez total intermédia ($\approx 9,7$ g/L), enquanto a bebida fermentada C ultrapassa os 13,8 g/L, valor elevado, mas coerente com fermentações baseadas exclusivamente em melação. Este comportamento deve-se, em parte, à maior riqueza mineral do melação, à sua capacidade tampão mais acentuada e à presença de compostos precursores metabólicos (como aminoácidos, ácidos fenólicos e outros compostos azotados), que favorecem a produção e acumulação de ácidos orgânicos ao longo da fermentação (Palmonari et al., 2020b).

Adicionalmente, substratos mais complexos como o melação proporcionam ambientes mais favoráveis à atividade anaplerótica das leveduras, conduzindo à biossíntese de ácidos como o succínico, acético e pirúvico, o que contribui para o aumento da acidez total. Este efeito é amplificado em fermentações prolongadas ou em ambientes com maior densidade nutricional (Feng et al., 2023).

Relativamente à acidez volátil, os valores obtidos foram de $0,78 \pm 0,06$ g/L em A, $0,84 \pm 0,02$ g/L em B, e $0,93 \pm 0,04$ g/L em C, apresentando também uma ligeira tendência crescente com o aumento da proporção de melação. Estes valores situam-se próximos do limite superior geralmente aceite para vinhos e hidroméis bem fermentados, cujo intervalo típico é entre 0,6 e 0,9 g/L de ácido acético (Cebrián-Tarancón et al., 2024; Waterhouse, 2018).

A acidez volátil resulta principalmente da produção de ácido acético por parte das leveduras durante a fermentação alcoólica e pode ser influenciada por fatores como a aerobiose acidental, o stress nutricional ou o teor elevado de açúcares. Neste estudo, os valores mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis, indicando um processo fermentativo controlado, sem sinais de contaminação bacteriana ou de oxidação. No entanto, o valor mais elevado na bebida fermentada C pode estar relacionado à maior reatividade do melação, cuja composição favorece a formação de ácidos voláteis, especialmente em ambientes de maior carga osmótica e mineral.

O teor de SO₂ total também revelou diferenças significativas entre as três bebidas fermentadas. A bebida A apresentou 60,16 ± 1,81 mg/L; a B, 94,72 ± 3,62 mg/L; e a C, 161,28 ± 3,62 mg/L. Estes resultados refletem, novamente, o impacto do substrato na composição química final da bebida. O mel, com baixo teor de compostos fenólicos e carboxílicos, apresenta menor tendência a interações com o SO₂, o que explica os valores mais baixos observados. Por outro lado, o melaço contém diversos compostos altamente reativos, como ácidos orgânicos, açúcares redutores e metais de transição, que formam complexos estáveis com o dióxido de enxofre, exigindo maiores quantidades de SO₂ para assegurar a mesma ação antimicrobiana e antioxidante (Webster et al., 2025; Palmonari et al., 2020c).

De acordo com as diretrizes da Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV, 2023), o teor máximo permitido de SO₂ total em vinhos e hidroméis situa-se entre 150 e 200 mg/L, o que torna tecnicamente aceitáveis os valores obtidos. Assim, embora a bebida C apresente um teor de SO₂ superior ao das demais, este valor permanece dentro dos limites regulamentares, justificado pela maior necessidade de proteção antioxidante e microbiológica devido à maior reatividade do substrato.

Tabela 14: Resultados das análises químicas das bebidas fermentadas.

Bebidas fermentadas	Acidez total final (g/l)	Acidez volátil (g/l)	So ₂ total (mg/l)
A	5,44 ± 0,16 ^a	0,78 ± 0,06 ^a	60,16 ± 1,81 ^a
B	9,68 ± 0,21 ^b	0,84 ± 0,02 ^a	94,72 ± 3,62 ^b
C	13,8 ± 0,10 ^c	0,93 ± 0,04 ^b	161,28 ± 3,62 ^c

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

Em conjunto, os resultados obtidos evidenciam que a incorporação de melaço na formulação das bebidas fermentadas influencia significativamente os parâmetros químicos finais. O aumento da acidez total, a manutenção de níveis controlados de acidez volátil e o maior teor de SO₂ total evidenciam o impacto da composição da matéria-prima na fermentação, na estabilidade e na qualidade sensorial da bebida. Estes efeitos devem ser tidos em conta na formulação e no controlo tecnológico da produção de hidromel, especialmente quando se pretende utilizar subprodutos, como o melaço.

5.4.5. Teor alcoólico (% v/v) e rendimento da fermentação

O teor alcoólico final das bebidas fermentadas foi determinado por dois métodos analíticos: destilação/ebuliometria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados obtidos por ebuliometria foram de $10,25 \pm 0,07\%$ v/v para as bebidas fermentadas A, $10,35 \pm 0,21\%$ para o B e $10,10 \pm 0,14\%$ para o C, enquanto os valores determinados por HPLC foram, respetivamente, 10,30%, 10,84% e 9,35% (Tabela 15). A elevada concordância entre os dois métodos confirma a fiabilidade das medições e a consistência da produção de etanol ao longo do processo fermentativo, finalizado após sete dias.

As ligeiras discrepâncias entre os dois métodos são consideradas aceitáveis do ponto de vista técnico. A ebuliometria tende a sobrestimar ligeiramente o teor alcoólico, devido à interferência de outros compostos voláteis presentes na matriz fermentada, como álcoois superiores, ésteres e aldeídos, conforme descrito por Webster et al. (2025). O método cromatográfico, por sua vez, fornece valores mais específicos, ao quantificar unicamente o etanol.

Os valores de teor alcoólico encontrados situam-se dentro do intervalo típico para hidroméis secos (entre 9 e 12% v/v), conforme descrito por Gomes et al., (2013) e Mendes-Ferreira et al. (2010), o que evidencia um processo fermentativo eficiente, sem indícios de inibição alcoólica ou de fermentações incompletas.

O rendimento da fermentação alcoólica, calculado com base na conversão dos açúcares iniciais em etanol, variou entre 79,7% (A) e 90,2% (B). O mosto B (50% mel e 50% melaço) destacou-se por apresentar o valor alcoólico mais elevado e o rendimento mais eficiente, possivelmente devido ao perfil nutricional mais equilibrado da mistura. A adição de melaço contribui para a presença de compostos azotados, minerais e fatores de crescimento, que favorecem a viabilidade celular e a atividade fermentativa de *S. cerevisiae* (Palmonari et al., 2020b; Vicente et al., 2022). Além disso, a combinação de mel e melaço parece ter resultado numa matriz com boa disponibilidade de açúcares fermentescíveis e um balanço redox adequado, potenciando a eficiência global do processo.

Apesar da bebida C (100% melaço) apresentar uma concentração de açúcares semelhante à bebida B, o teor de etanol final foi ligeiramente inferior (9,35% v/v), o que poderá dever-se a fatores inibitórios associados ao melaço, como a presença de compostos de Maillard, fenóis ou metais pesados em concentrações traço, que podem interferir com a

atividade metabólica da levedura (Feng et al., 2023). Ainda assim, o rendimento observado nesta amostra (87,8%) evidencia uma fermentação robusta e completa, mesmo em substrato alternativo.

Tabela 15: Teor alcoólico das bebidas fermentadas e o rendimento alcoólico.

Bebida fermentada	Açúcares totais (g/L ± DP)	Etanol (% v/v ± DP)	Rendimento (% ± DP)
A	198,6 ± 3,4 ^a	10,25 ± 0,08 ^a	79,7 ± 1,5 ^b
B	177,2 ± 2,1 ^b	10,35 ± 0,05 ^a	90,2 ± 1,2 ^a
C	177,7 ± 3,0 ^b	10,10 ± 0,06 ^a	87,8 ± 1,0 ^a

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em síntese, os resultados obtidos confirmam a eficácia do processo fermentativo em todas as formulações testadas. A utilização do melaço, total ou parcial, revelou-se uma estratégia viável para a produção de bebidas fermentadas, com impacto positivo sobre o rendimento alcoólico, sobretudo quando combinado com o mel. Assim, conclui-se que o melaço de cana-de-açúcar é um substrato seguro, economicamente acessível e tecnologicamente eficaz, com potencial para a diversificação e sustentabilidade da produção de bebidas fermentadas, aliando inovação tecnológica à valorização de subprodutos agroindustriais.

CAPÍTULO V

Considerações finais

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, avaliou-se o impacto da substituição parcial e total do mel por melaço de cana-de-açúcar na formulação de mostos destinados à produção de bebidas fermentadas, considerando parâmetros microbiológicos, físico-químicos e fermentativos. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças relevantes entre as três formulações testadas, demonstrando que a composição do substrato exerce influência decisiva na dinâmica fermentativa e na qualidade final do produto.

- Do ponto de vista microbiológico, todas as formulações favoreceram o crescimento eficiente de *S. cerevisiae*, com início rápido da fase exponencial, indicando uma adaptação eficaz das leveduras às condições experimentais. A substituição parcial (50%) ou total (100%) do mel por melaço não comprometeu a viabilidade celular nem a eficiência da fermentação. Pelo contrário, o mosto com 100% de melaço (C) apresentou ligeira superioridade na densidade ótica e na biomassa final, resultado associado à maior riqueza nutricional do melaço, especialmente em azoto e minerais.
- A composição sacarídica inicial dos mostos revelou perfis distintos: o mel apresentou predominância de açúcares redutores (glicose e frutose), e o melaço, principalmente sacarose. Esta diferença refletiu-se na cinética de consumo de açúcares: a fermentação do mosto A (100% mel) foi mais lenta e incompleta, com açúcares residuais mais elevados, mesmo após suplementação. Por sua vez, os mostos B e C evidenciaram fermentações mais rápidas e completas, o que confirma a glucofilia típica de *S. cerevisiae* e a maior eficácia na metabolização de açúcares em matrizes mais equilibradas.
- A suplementação azotada dos mostos foi essencial para garantir fermentações completas. Após o ajuste com 0,60 g/L de nutriente, todas as formulações atingiram valores de YAN superiores a 140 mg N/L, o que se considera o limiar mínimo para fermentações robustas em condições enológicas. Os resultados mostraram, ainda, que o melaço contribui naturalmente para níveis mais elevados de azoto assimilável, o que se traduziu em valores residuais mais altos ao final da fermentação, indicando maior margem de segurança nutricional. No entanto, este desempenho só foi alcançado com a correção nutricional prévia, o que é um ponto crítico para o sucesso da fermentação com melaço.
- A combinação de mel e melaço na proporção 50/50 revelou-se a formulação mais eficiente, permitindo conciliar a disponibilidade de açúcares fermentescíveis com um

perfil nutricional mais completo, o que resultou em bom rendimento etanólico e melhor desempenho fermentativo.

- Em relação à acidez, verificou-se um aumento progressivo da acidez total com a incorporação de melaço: de 5,44 g/L em A a 13,8 g/L em C. Esta tendência é atribuída ao elevado teor mineral do melaço, à sua maior capacidade tampão e à presença de precursores metabólicos que favorecem a biossíntese de ácidos orgânicos. A acidez volátil manteve-se dentro dos limites aceitáveis para bebidas fermentadas (<1 g/L), não se registrando valores indicativos de fermentações defeituosas. O teor de dióxido de enxofre total também aumentou com a proporção de melaço, devido à maior reatividade química da matriz, mas permaneceu dentro dos limites legais estabelecidos pela OIV (2023), assegurando a estabilidade microbiológica das bebidas.
- De forma geral, os resultados demonstram que o melaço de cana-de-açúcar é um ingrediente viável, eficaz e seguro para a produção de bebidas fermentadas, tanto do ponto de vista microbiológico quanto do tecnológico. A mistura de 50% de mel e 50% de melaço revelou-se particularmente vantajosa, conjugando alta eficiência fermentativa, rendimento alcoólico otimizado e composição final equilibrada. Este estudo contribui ainda para a valorização de subprodutos agroindustriais, promovendo uma abordagem mais sustentável na produção de bebidas fermentadas.
- A utilização do melaço, um subproduto económico e amplamente disponível, permite reduzir a dependência do mel, preservando as características do hidromel tradicional. No entanto, a suplementação nutricional adequada é imprescindível para assegurar o sucesso da fermentação, sobretudo em substratos de composição variável. O presente trabalho abre, assim, novas perspectivas para a diversificação de matérias-primas na produção de bebidas fermentadas, combinando inovação tecnológica, sustentabilidade e valorização de recursos subutilizados.

7. PERSPETIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos, que demonstraram a viabilidade da substituição parcial do mel por melaço na produção de bebidas fermentadas, abrem-se diversas possibilidades de investigação futura e desenvolvimento tecnológico:

- **Avaliação de diferentes tipos de melaço** - Estudos futuros poderão explorar a utilização de melaços provenientes de outras fontes vegetais (ex. beterraba, sorgo) ou de diferentes processos industriais, avaliando o seu impacto na composição, fermentabilidade e perfil sensorial do hidromel.
- **Otimização da suplementação nutricional** - Embora o melaço fornecia micronutrientes adicionais, sua composição pode variar significativamente entre lotes. Investigações adicionais poderão centrar-se na formulação de regimes de suplementação específicos (ex. azoto assimilável, vitaminas, minerais) adaptados a cada tipo de substrato, com vista a maximizar o rendimento fermentativo e a estabilidade do produto final.
- **Avaliação da estabilidade e envelhecimento da bebida** - Será relevante acompanhar a evolução físico-química e sensorial dos hidroméis com melaço durante o armazenamento, a fim de compreender melhor a sua estabilidade, potencial de envelhecimento e vida útil.
- **Caracterização sensorial aprofundada** - O perfil sensorial das formulações com diferentes proporções de melaço pode ser explorado em maior detalhe com recurso a análise descritiva quantitativa (QDA) e estudos de preferência com consumidores, com vista à adaptação do produto a diferentes nichos de mercado.
- **Escalonamento industrial e avaliação económica** - Uma vez demonstrada a viabilidade técnica à escala laboratorial, torna-se pertinente realizar estudos piloto em escala semi-industrial, incluindo uma análise do custo-benefício, viabilidade económica e impacto ambiental da substituição do mel por melaço.
- **Estudo do impacto microbiológico e da diversidade de leveduras** - Investigações futuras poderão também avaliar o comportamento fermentativo de estirpes não convencionais ou de consórcios microbianos, com o intuito de melhorar o perfil aromático, a complexidade sensorial e a resiliência do processo fermentativo.
- **Aplicação em bebidas funcionais ou mistas** - A incorporação de ingredientes com propriedades funcionais (ex. infusões vegetais, especiarias, frutas) combinados com melaço poderá ser explorada como estratégia de inovação para o desenvolvimento

de novos produtos fermentados com apelo sensorial e benefícios nutricionais acrescidos.

CAPÍTULO VI

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS

- Almazan, F., González, A., & Rivera, J. L. (1998). Sugar cane processing and by-products. *Sugar Industry Journal*, 123(4), 210–216.
- Amorim, F. C. M. & Lopes, M. L. (2019). Efeitos da composição do melão de cana-de-açúcar na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 12(2), 45–58.
- Angela, C., Young, J., Kordayanti, S., & Devanthi, P. V. P. (2020). Isolation and screening of microbial isolates from kombucha culture for bacterial cellulose production in sugarcane molasses medium. *KnE Life Sciences*.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis of AOAC International* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis of AOAC International* (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Barros, R. M. (2023). Melão de cana-de-açúcar: composição química, propriedades funcionais e aplicações industriais. Editora Acadêmica.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (2003). *Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 95(6), 511–518.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204-209.
- Bogdanov, S., Martin, P., & Lüllmann, C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, Extra Issue, 1–59.
- Bogdanov, S. (2009). *Harmonised methods of the International Honey Commission: pH and free acidity by titration to pH 8.3* (pp. 21–22). International Honey Commission.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S4–S17.

- Bolanos de la Torre, A. A. S., Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. K. (2015). *A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey*. *Food Chemistry*, 174, 119-123.
- Buchanan, P. (2006). *Mead madness: The complete guide to making mead*. Brewers Publications.
- Catelli, A. A., Cuenca, A. R., & Iglesias, J. R. (2015). Mead: Production, classification and quality parameters. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 412–419.
- Cebrián-Tarancón, C., & others. (2024). Chemical and sensorial profile of Tempranillo wines with special enological granulates and micro-oxygenation. *Food Chemistry*, 138913.
- Chatzitheodoridou, Dimitra. *Nutrient-dependent regulation of histone homeostasis in Saccharomyces cerevisiae*. Diss. Imu, 2024.
- Chung, H. Y., Kim, H. J., & Kim, E. (2021). *Melanoidins and phenolic compounds in food processing: formation mechanisms and antioxidant properties*. *Food Chemistry*, 350, 129280.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). *Yeast interactions in inoculated wine fermentation*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 555.
- Codex Alimentarius. (2001). *Revised standard for honey (CODEX STAN 12-1981)*.
- Correia, D. M., Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Dias, T., Rocha, I., Rodrigues, L. R., & Peres, A. M. (2014). Dietary sugars analysis: Quantification of fructooligosaccharides during fermentation by HPLC-RI method. *Frontiers in Nutrition*, 1.
- Christofi, M., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M. (2022). *Yeast assimilable nitrogen requirements and nitrogen management strategies in alcoholic fermentations: a review*. *Fermentation*, 8(6), 262.
- Curtin, L. V. (1973). Molasses—General considerations. *Feedstuffs*, 45(50), 45–46.
- Curvelo-Garcia, A. S. (1998). Determinação de dióxido de enxofre total (SO₂) em hidromel por titulação iodométrica (método Ripper). In A. S. Curvelo-Garcia & P. Barros (Eds.), *Práticas Enológicas Internacionalmente Reconhecidas – Química Analítica* (capítulo sobre ácido sulfuroso (SO₂)). Quântica Editora.

- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.
- El Asri, O., & Farag, M. A. (2023). The potential of molasses from different dietary sources in industrial applications: A source of functional compounds and health attributes, a comprehensive review. *Food Bioscience*, 56, 103263.
- El-Gendy, N. S., Madian, H. R., & Amr, S. S. A. (2013). Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*, 2013(1), 815631.
- Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G., Lino, F. S. de O., Sommer, M. O. A., Gombert, A. K., Giudici, R., & Basso, T. O. (2023). *Physiology of Saccharomyces cerevisiae during growth on industrial sugar cane molasses can be reproduced in a tailor-made defined synthetic medium*. *Scientific Reports*, 13, 10567.
- Escuredo, O., Seijo, M. C., Fernández-González, M., & Seijo, C. C. (2013). Nutritional value and mineral content of honey produced in the northwest of Spain. *Food Chemistry*, 138(2–3), 851–856.
- European Commission. (2002). Council Directive 2001/110/EC relating to honey.
- European Commission (2022). Microbiological criteria and food safety guidance for honey (Reg. aplicável em alimentos).
- Fadel, M., Keera, A. A., Mouafi, F. E., & Kahil, T. (2013). *High level ethanol production from sugarcane molasses by a newly isolated Saccharomyces cerevisiae strain*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(5), 4171–4178.
- Feedtables.com. (2025). *Molasses, sugarcane – Tables of composition and nutritional values*. *Feedtables.com*. Recuperado de <https://www.feedtables.com/content/molasses-sugarcane>
- Felipe, A. L. D., Souza, C. O., Santos, L. F., & Cestari, A. (2019). Synthesis and characterization of mead: From the past to the future and development of a new fermentative route. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4966–4971.
- Feng, Z., & others. (2023). Volatile and sensory characterisation of Tempranillo wines with different treatments. *LWT*, 113360.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 11–22.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization (2020). Codex Alimentarius: Principles and guidelines for honey and food safety criteria. FAO/WHO Codex Alimentarius Commission.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2025). Sugarcane molasses: Composition and characteristics.
- Fu, Y., Shi, X., Li, F., Yan, X., Li, B., Luo, Y., Jiang, G., Liu, X., & Wang, L. (2023). Fermentation of mead using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus paracasei*: Strain growth, aroma components and antioxidant capacity. *Food Bioscience*, 52, 102402.
- Geremew Kassa, M., Asemu, A. M., Belachew, M. T., Satheesh, N., Abera, B. D., & Alemu Teferi, D. (2024). Review on the application, health usage, and negative effects of molasses. *CyTA – Journal of Food*, 22(1), 2321984.
- Ghadigaonkar, S., Reddy, A. G., Kalakumar, B., Lakshman, M., & Rajkumar, U. (2021). Quantification of total phenolic content, total flavonoid content and evaluation of in vitro free radical scavenging activities in *Ficus religiosa* Linn. *The Pharma Innovation Journal*, 10(3), 84–88.
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., & Jiranek, V. (2019). *The role of yeast assimilable nitrogen in wine fermentation: balancing fermentation performance and aroma production*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4), 1136–1150.
- Gomes, R. J. (2018). Evaluation of sugarcane molasses as substrate for the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* using factorial design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 34–40.
- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3448–3454.
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. M. (2013). Optimization of mead production using response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 680–686.
- Gomes, T. M. da C. (2010). Produção de Hidromel: Efeito das condições de fermentação [Dissertação, Instituto Politécnico de Bragança].
- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á., & Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition

of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2574–2580.

- González, R., Gutiérrez, N., & Morales, P. (2021). Nutrient regulation of yeast growth under stress conditions: Revisiting Monod’s model in modern fermentative systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(12), e01084-21.
- Guimarães, C. M., Gião, M. S., Martinez, S. S., Pintado, A. I., Pintado, M. E., Bento, L. S., & Malcata, F. X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *Journal of Food Science*, 72(1).
- Gupta, J. K., & Sharma, R. (2009). Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review.
- Gutiérrez, L., Pérez-Torres, C., & Morales, A. (2022). *Effects of Maillard reaction products and sugar composition on yeast metabolic activity in high-gravity fermentation media*. *Food Microbiology*, 103, 103934.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (s.d.). Tabela da composição de alimentos portugueses. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.
- ISO 21528-2:2017 (Organização Internacional de Normalização). ISO (2017). *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count technique*.
- Jamir, L., Kumar, V., Bhasin, J. K., Kumar, S., & Singh, H. (2021). Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: A critical review. *Environmental Technology Reviews*, 10(1), 131–142.
- Kaur, H., & Keshri, R. (2020). Production of ethanol from sugarcane molasses. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 7(5), 93–97.
- Kępa, P., Novak, D., & Zieliński, P. (2022). *Microbiological quality and safety parameters in commercial molasses products*. *International Journal of Food Microbiology*, 378, 109843.
- Kong, F., Singh, R. P., & Li, H. B. (2016). Sugarcane molasses: A potential source of phenolic compounds with antioxidant, anti-inflammatory and anti-mutagenic properties. *Journal of Functional Foods*, 24, 177–185.
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS ONE*, 7(3), e32436.

- Laluce, C., Leite, G. R., Zavitoski, B. Z., Zamai, T. T., & Ventura, R. (2016). Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In C. Laluce (Ed.), *Sugarcane-based biofuels and bioproducts* (pp. 53–86). Academic Press.
- Maddocks, S. E., & Jenkins, R. E. (2013). Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11), 1419–1429.
- Majewska, E., & Drużyńska, B. (2025). Validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on honeys, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Applied Sciences*, 15(20), 11234.
- Makul, N., & Sua-iam, G. (2016). Utilization of sugarcane bagasse ash in construction materials: A review. *Construction and Building Materials*, 118, 26–36.
- Malomo, S. A., Onilude, A. A., & Adebayo-Tayo, B. C. (2015). Microbiological quality and physicochemical properties of molasses-based beverages. *African Journal of Food Science*, 9(10), 511–517.
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). *Honey: its medicinal property and antibacterial activity*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154–160.
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & van Boekel, M. A. J. S. (2018). *A review of Maillard reaction in food and the formation and potential role of melanoidins in antioxidant activity*. *Food Research International*, 113, 37–52
- Mattietto, R. de A., de Lima, F. C., Venturier, G. C., & Araújo, Á. A. (2006). Tecnologia para obtenção artesanal de hidromel do tipo doce. 1–5.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C. S., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17593–17598.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., & Mendes-Faia, A. (2010). Effect of nitrogen supplementation on fermentation kinetics and aroma compounds production by *Saccharomyces cerevisiae* during mead fermentation. *Food Chemistry*, 119(1), 160–168.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Molina-Cortés, A., Tobar-Tosse, F., Quimbaya, M., Álvarez-Rivera, G., Cifuentes, A., & Jaramillo-Botero, A. (2025). Study of two sugarcane by-products as source of

secondary metabolites and heat-induced compounds with potential bioactive applications. *Scientific Reports*, 15(1), 19788.

- Mordenti, A. L., Giaretta, E., Campidonico, L., Parazza, P., & Formigoni, A. (2021). A review regarding the use of molasses in animal nutrition. *Animals*, 11(1), 115.
- Navrátil, M., Šturdík, E., & Gemeiner, P. (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 23(12), 977–982.
- Noureldin, H., Salman, K., Ali, H., & Mansour, A. (2020). Using of sugarcane molasses on novel-yoghurt making. *Archives of Agriculture Sciences Journal*, 3(2), 156–167.
- Ochoa, D., Tapia, E., & Pérez, L. (2010). Sugarcane molasses as a raw material for industrial fermentation processes. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 197–203.
- Organização Internacional da Vinha e do Vinho. (1990). *Compendium of international methods of wine and must analysis: Method OIV-MA-AS313-11* (Determination of total acidity). OIV.
- Organização Internacional da Vinha e do Vinho. (2006). *Compendium of international methods of wine and must analysis: Method OIV-MA-AS2-03* (Determination of sugar content in grape musts). OIV.
- Organização Internacional da Vinha e do Vinho. (2019). *Método de determinação do pH em mostos e vinhos* (OIV-MA-AS313-15). OIV – Compendium of International Methods of Analysis.
- Oroian, M., & Ropciuc, S. (2017). Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, 60(1), 301–306.
- Paula, V. B., Sousa-Dias, M. L., Seixas, N. L., Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L. M., & Dias, L. G. (2024). *Phenolic class analysis in honey: Comparison of classical and single UV spectrum methodologies*. *Processes*, 12(10), 2297.
- Palmonari, A., Canestrari, G., Bonfante, E., Mammi, L. M. E., Fustini, M., Grilli, E., & Formigoni, A. (2020a). Sugarcane molasses as an ingredient in animal nutrition: Nutritional characteristics and effects on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114405.
- Palmonari, A., Cavallini, D., Sniffen, C. J., Fernandes, L., Holder, P., Fagioli, L., Fusaro, I., Biagi, G., Formigoni, A., & Mammi, L. (2020b). Short communication:

Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 6244–6249.

- Palmonari, A., Rossi, L., & Silva, M. (2020c). *Bioactive compounds and antioxidant properties of sugarcane molasses: phenolics, flavonoids, and Maillard reaction products*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 88, 103459.
- Pajampa, K., & Wongwuttanasatian, T. (2023). A trial of filter cake pellets and bagasse co-combustion in a sugar mill steam generator: Thermal and economical assessments. *Energy Reports*, 9, 422–430.
- Pereira, L. F., Sousa, M. J., & Campos, A. (2021). Pré-tratamentos físicos e químicos de melaço para otimização da fermentação alcoólica. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100698.
- Pereira, A. C., Silva, F. R., & Souza, J. R. (2013). *Métodos químicos para determinação de acidez em mostos e vinhos*. *Revista Brasileira de Enologia*, 15(2), 45–52.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 21–30.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2015). Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 405–410.
- Persano Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38–S81.
- Pohl, P., Sergiel, I., & Stecka, H. (2020). Determination and chemometric analysis of the content of minerals in honeybee-collected pollen and honey. *Heliyon*, 6(5), e03917.
- Queensland Department of Primary Industries. (1975). *Queensland molasses survey*. Queensland Department of Primary Industries.
- Rabelo, S. C., Carrere, H., Maciel Filho, R., & Costa, A. C. (2009). Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100(23), 5865–5872.
- Ramalhosa, E., Pereira, A. P., & Baptista, P. (2011). Yeast diversity and fermentation characteristics in traditional fermented beverages. *Food Research International*, 44(5), 1305–1313.

- Samaniego-Sánchez, C., Marín-García, G., & Quesada-Granados, J. J. (2020). A new fermented beverage from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) molasses: Analysis of physicochemical properties and antioxidant capacity, and comparison with other industrial alcohol products. *LWT*, *128*, 109505.
- Sancho, M., Muniategui, S., Sánchez, C., Huidobro, L., & Simal, P. (1991). *Electrical conductivity measurement method for honey* [Método de medição de condutividade elétrica em mel]. *Apidologie*, 355–360.
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, *118*(2), 391–397.
- Silva, K. A., Cunha, G. C. G., Lino, F. S. O., Sommer, M. O. A., Gombert, A. K., Giudici, R., & Basso, T. O. (2021). *Physiology of Saccharomyces cerevisiae during growth on industrial sugarcane molasses can be reproduced in a tailor-made defined synthetic medium*. *Scientific Reports*, *11*, 23183. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02643-3>
- Silva, R. F., Oliveira, R. P., & Santos, D. L. (2021). *Impact of physicochemical parameters on the alcoholic fermentation performance of Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(4), 1754–1766.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2020). Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food Chemistry*, *346*, 128860.
- Sroka, P., & Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, *104*(3), 1250–1257.
- Starowicz, M., & Granvogl, M. (2020). Trends in food science & technology: An overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. *Trends in Food Science & Technology*, *106*, 402–416.
- Stewart, L. F. (2010). *The complete meadmaker: Home production of honey wine from your first batch to award-winning fruit and herb variations*. Voyageur Press.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, *2*(3), 472–499.
- Tronchoni, J., Rozès, N., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* species and their

hybrids during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 237–243.

- Truchado, P., Gil, M. I., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). *Simple and rapid solid-phase extraction method for the analysis of phenolic compounds in honey*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5724–5731.
- Ungureanu, N., Vlăduț, V., & Biriș, S. Ș. (2022). Sustainable valorization of waste and by-products from sugarcane processing. *Sustainability*, 14(17), 11089.
- Vaz, A. S. G. (2016). Estudo de segurança alimentar do melão—Provar que o melão produzido na RAR Açúcar é próprio para consumo humano [Universidade do Minho - Escola de Engenharia; Universidade do Porto - Faculdade de Ciências].
- Vicente, S. C., Gonçalves, F. J., Mendes-Ferreira, A., & Hogg, T. (2022). *Nitrogen availability and stress tolerance modulate yeast viability and fermentation kinetics in alcoholic fermentations*. *Food Microbiology*, 103, 103944.
- Waterhouse, A. L. (2018). *Wine phenolics and volatile acidity*. In *Understanding Wine Chemistry* (pp. 211–230). Wiley-Blackwell.
- Webster, C. E., Barker, D., Deed, R. C., & Pilkington, L. I. (2025). Mead production and quality: A review of chemical and sensory mead quality evaluation with a focus on analytical methods. *Food Research International*, 115655.