

Influência da adição de centeio ibérico maltado na cinética fermentativa e no perfil físico-químico e bioativo do hidromel

Amanda Georg Gebim

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação
com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.*

Orientado por

**Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho
Doutora Vanessa Marina Branco Paula
Professora Doutora Alessandra Machado Lunkes**

**Bragança
2026**

Este trabalho foi em financiado pelo Projeto PRR (PRR-C05-I03-i-000161) com o título de “**Desenvolvimento de cadeias de valor de cereais tradicionais para uma alimentação sustentável em Portugal**”. O projeto está inserido na medida 12 - Alimentação sustentável e tem financiamento Nacional e Europeu. O projeto tem como objetivo promover a produção do cereal tradicional de Portugal e criar uma cadeia de valor que envolva os produtores, transformadores, comerciantes e consumidores.



Agradecimentos

A realização desta dissertação representa o encerramento de uma etapa muito importante da minha trajetória acadêmica e pessoal, marcada por desafios, crescimento e aprendizagens que não teriam sido possíveis sem o apoio de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho, pela orientação, disponibilidade, confiança e pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste trabalho.

Agradeço, de forma especial, à minha coorientadora, Doutora Vanessa Marina Branco Paula, por toda a orientação, apoio, disponibilidade e paciência ao longo desta caminhada. Obrigada por todas as conversas, conselhos, sugestões e por acompanhar de perto o desenvolvimento deste trabalho, contribuindo não apenas para a realização desta investigação, mas também para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Agradeço igualmente à Professora Doutora Alessandra Machado Lunkes pelo acompanhamento, apoio científico e contribuições fundamentais para o desenvolvimento desta investigação.

À Escola Superior Agrária de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, agradeço pela oportunidade de realização da dupla diplomação e por toda a formação proporcionada durante este percurso acadêmico.

Aos professores, colegas e técnicos de laboratório que, de alguma forma, contribuíram para a execução experimental deste trabalho, deixo o meu sincero agradecimento pela ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimentos. Deixo um agradecimento particular à Professora Bruna Carbas e ao Engenheiro Samurai, pela paciência, empenho e disponibilidade em todas as análises realizadas, bem como pelos auxílios prestados ao longo deste trabalho. Agradeço também à Dona Fátima, por todas as vezes em que me ajudou no laboratório, mesmo quando isso vinha acompanhado de um olhar sério, de um jeito direto e de uma expressão que já dizia tudo antes mesmo de qualquer palavra. A sua presença, com o seu jeito único e inconfundível, fez parte da rotina laboratorial e tornou este percurso certamente mais memorável.

Agradeço profundamente aos meus pais, por serem a minha base, o meu maior exemplo de amor, força e dedicação. Obrigada por todo o apoio incondicional, por cada incentivo, por cada sacrifício feito ao longo da minha vida e por nunca medirem esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Mesmo à distância, estiveram presentes em todos os momentos, me dando força quando as dificuldades pareciam maiores, acreditando em mim quando eu mesma duvidei e me lembrando sempre do valor da

persistência. Esta conquista é também de vocês, pois carrega tudo aquilo que me ensinaram: coragem, responsabilidade, honestidade e determinação. Nada disso teria sido possível sem o amor, a confiança e o apoio que sempre recebi de vocês.

À minha namorada, agradeço pela companhia, paciência, apoio emocional e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, assim como nas pequenas conquistas ao longo desta jornada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta dissertação e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada.

ÍNDICE GERAL	
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Mel como substrato fermentativo	2
1.2 Centeio como fonte de enriquecimento nutricional.....	6
1.3 Malteação como estratégia de melhoria fermentativa	8
1.4 Hidromel: produção e características	10
1.5 Objetivos.....	14
1.5.1 Objetivo geral	14
1.5.2 Objetivos específicos.....	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 Caracterização polínica e físico-química do mel.....	16
2.1.1 Análise Polínica.....	16
2.1.2 Hidroximetilfurfural	17
2.1.3 Índice diastásico	17
2.1.4 Acidez total.....	18
2.1.5 pH	18
2.1.6 Umidade	19
2.1.7 Cinzas	19
2.1.8 Condutividade elétrica.....	19
2.1.9 Açúcares redutores	19
2.2 Caracterização físico-química do centeio ibérico.....	20
2.2.1 Proteínas	21
2.2.2 Lipídios totais	22
2.2.3 Umidade - Matéria seca.....	22
2.2.4 Cinzas	23
2.2.5 Carboidratos totais.....	24
2.2.6 Açúcares solúveis	24
2.3 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante	25
2.3.1 Extração dos compostos fenólicos.....	25
2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais	25
2.3.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP.....	26
2.3.4 Redução do radical livre DPPH.....	26

2.4 Processo de malteação do centeio	27
2.5 Matérias-primas e Aditivos Fermentativos.....	28
2.5.1 Água	28
2.5.2 Levedura	28
2.5.3 Nutriente comercial	29
2.5.4 Centeio Ibérico	29
2.6 Preparação dos mostos para a fermentação	30
2.7 Monitorização da Cinética Fermentativa.....	32
2.7.1 Biomassa celular.....	33
2.7.2 Nitrogênio Assimilável.....	33
2.7.3 Açúcares redutores	34
2.7.4 Produtos da fermentação	35
2.7.5 pH	36
2.7.6 Sólidos solúveis	36
2.7.7 Acidez total.....	37
2.7.8 Acidez volátil.....	37
2.7.9 Dióxido de enxofre	37
2.7.10 Eficiência fermentativa.....	38
2.7.11 Avaliação de efeitos sinérgicos/antagónicos nos hidroméis.....	38
2.8 Tratamento estatístico.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Caracterização polínica e físico-química do mel.....	42
3.2 Centeio ibérico.....	45
3.2.1 Eficiência da malteação	45
3.2.2 Caracterização físico-química do centeio ibérico.....	46
3.2.3 Compostos bioativos e capacidade antioxidante no centeio.....	48
3.2.4 Nitrogênio assimilável no centeio	51
3.3 Caracterização físico-química do mosto e do hidromel	52
3.3.1 Cinética de crescimento microbiano durante a fermentação	52
3.3.2 Nitrogênio assimilável no mosto e hidromel.....	55
3.3.3 Cinética de consumo de açúcares	57
3.3.4 Acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total	62
3.3.5 Teor alcóolico e eficiência fermentativa	64
3.3.6 Bioatividade do hidromel	65
4 CONCLUSÕES.....	69
BIBLIOGRAFIA	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referências dos parâmetros do mel.	3
Tabela 2 - Valores de referência dos parâmetros físico-químicos de centeio não maltado.	7
Tabela 3 - Parâmetros de análise, matriz, periodicidade e referências.	32
Tabela 4 - Caracterização polínica da amostra de mel.	42
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos analisados no mel.	43
Tabela 6 - Resultados da caracterização físico-química do centeio em estudo.	46
Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante das farinhas de centeio não maltado e maltado.	48
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Tabela 9 - Parâmetros de suplementação e substituição do nutriente comercial Enovit.	56
Tabela 10 - Perfil de açúcares residuais e caracterização final dos hidroméis.	60
Tabela 11 - Efeito da adição de centeio na acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total do hidromel.	62
Tabela 12 - Efeito da adição de centeio na produção de etanol e eficiência fermentativa.	64
Tabela 13 - Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/mL) e capacidade antioxidante (mg Fe ²⁺ /mL) em hidromel com diferentes concentrações de centeio.	65
Tabela 14 - Índice de sinergia (SI) para compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (FRAP) em hidromel com adição de centeio.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de mel na União Européia ao decorrer dos anos (anos vs toneladas) [21].	3
Figura 2 - Produção mundial de centeio e principais produtores na Europa nos períodos de 1961 e 2023 [42].	6
Figura 3 - Principais exportadores e importadores globais de bebidas fermentadas (HS 2206) em 2023, respectivamente [70].	11
Figura 4 - Fluxograma do processo de produção do hidromel [67].	12
Figura 5 - Mel do Parque de Montesinho Denominação de Origem Protegida.	16
Figura 6 - Fluxograma do processo de malteação do centeio [16]).	27
Figura 7 - Levedura utilizada na fermentação do hidromel.	29
Figura 8 - Nutriente comercial utilizado para complementar o mosto.	29
Figura 9 - Mostos com “airlock” em processo de fermentação.	31
Figura 10 - Diferenciação cromática das amostras antes (esquerda) e após (direita) o aquecimento a 100°C pelo método DNS.	35
Figura 11 - Perfil cromatográfico da injeção da mistura de padrões.	36
Figura 12 - Início do surgimento da radícula em grão de centeio ibérico durante a etapa de maceração.	45
Figura 13 - Efeito dos compostos bioativos do centeio maltado e não maltado.	49
Figura 14 - Contribuição de nitrogênio assimilável, expresso em mgN/L, de 50g/L de centeio não maltado e maltado adicionada a um mosto de mel.	51
Figura 15 - Cinética de crescimento microbiano durante a fermentação do hidromel.	53
Figura 16 - Evolução do YAN em função da percentagem de centeio antes e depois do ajuste.	55
Figura 17 - Teores de nitrogênio assimilável após o término da fermentação.	56
Figura 18 - Perfil cinético de consumo de açúcares redutores totais pelo método de DNS.	58
Figura 19 - Cinética de consumo de açúcares individuais e produção de metabólitos quantificados por HPLC.	59
Figura 20 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC da amostra final de hidromel suplementado com 5% de centeio ibérico maltado.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

mS/cm: MiliSiemens por centímetro

mgN/L: Miligramas de nitrogênio por litro

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

NaOH: Hidróxido de sódio

M: Molaridade (mol por litro)

Rpm: Rotações por minuto

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

Se: Selênio

HCl: Ácido clorídrico

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

UFC: Unidade formadora de colônia

OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

ANOVA: Análise de variância

°GL: Graus Gay-Lussac

DP: Desvio padrão

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

HMF: Hidrometilfurfural

RESUMO

O hidromel é uma bebida fermentada à base de mel cuja produção pode ser limitada pelo baixo teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras. Neste trabalho, avaliou-se o uso de farinha de centeio ibérico maltado como ingrediente tecnológico e bioativo na produção de hidromel.

Foram elaborados hidroméis com 1%, 2% e 5% de farinha de centeio maltado, além de um controle sem adição, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* QA23™. A suplementação influenciou positivamente a cinética fermentativa, sendo o efeito mais evidente no tratamento com 5%, que apresentou maior taxa específica de crescimento celular, menor tempo de duplicação e redução do tempo de fermentação de 192 para 96 horas em comparação ao controle. Apesar da aceleração do processo, os tratamentos mantiveram teores alcoólicos semelhantes, entre 10,32 e 11,10°GL, e eficiência fermentativa entre 82,77% e 85,50%.

Além do efeito tecnológico, a farinha de centeio ibérico maltado promoveu enriquecimento bioativo da bebida. Os compostos fenólicos totais aumentaram de 5,50 mg EAG/mL no controle para 9,91 mg EAG/mL no tratamento com 5% de farinha, enquanto a capacidade antioxidante por FRAP passou de 1,46 para 1,82 mg Fe²⁺/mL.

Os resultados indicam que a farinha de centeio ibérico maltado é uma alternativa promissora para acelerar a fermentação do hidromel sem comprometer o teor alcoólico ou a eficiência fermentativa, além de aumentar a capacidade antioxidante da bebida final.

Palavras-chave: hidromel; centeio ibérico; malteação; cinética fermentativa; compostos fenólicos; capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Mead is a honey-based fermented beverage whose production may be limited by the low content of yeast-assimilable nitrogen. This study evaluated the use of malted Iberian rye flour as a technological and functional ingredient in mead production.

Meads were produced with 1%, 2% and 5% malted rye flour, in addition to a control without flour addition, using *Saccharomyces cerevisiae* QA23™. Supplementation positively influenced fermentation kinetics, with the most evident effect observed in the 5% treatment, which showed a higher specific cell growth rate, shorter doubling time and a reduction in fermentation time from 192 to 96 hours compared to the control. Despite the accelerated process, the treatments maintained similar alcohol contents, ranging from 10,32 to 11,10 °GL, and fermentative efficiency between 82,77% and 85,50%.

In addition to its technological effect, malted rye flour promoted the functional enrichment of the beverage. Total phenolic compounds increased from 5,50 mg GAE/mL in the control to 9,91 mg GAE/mL in the 5% flour treatment, while antioxidant capacity determined by FRAP increased from 1,46 to 1,82 mg Fe²⁺/mL.

The results indicate that malted Iberian rye is a promising alternative to accelerate mead fermentation without compromising alcohol content or fermentation yield, while also increasing the antioxidant capacity of the final beverage.

Keywords: mead; Iberian rye; malting; fermentation kinetics; phenolic compounds; antioxidant capacity.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A diversificação de bebidas fermentadas tem sido um fenômeno crescente nas últimas décadas, impulsionada pela procura de produtos artesanais e naturais [1,2]. Neste contexto, o hidromel, bebida fermentada à base de mel, tem despertado interesse de produtores, investigadores e consumidores devido à sua relevância histórica, versatilidade sensorial e potencial de inovação tecnológica [3,4].

Apesar de o mel ser rico em açúcares simples e compostos bioativos, a sua utilização isolada como substrato fermentável apresenta limitações importantes. Em particular, a baixa disponibilidade de nitrogênio assimilável e de minerais essenciais dificultam o metabolismo das leveduras, prolongam a duração da fermentação e podem originar paragens fermentativas ou perfis sensoriais desequilibrados no hidromel final [5–7]. Para ultrapassar estas limitações e promover fermentações mais eficazes, têm sido exploradas estratégias como a suplementação nutricional do mosto com fontes nitrogenadas [8,9], a seleção de estirpes de leveduras de baixa exigência nutricional [3] e a adição de ingredientes complementares que possam enriquecer nutricionalmente o meio fermentativo [10].

Nesse contexto, a integração de ingredientes como cereais maltados surge como uma abordagem promissora para valorizar o hidromel. A malteação ativa enzimas endógenas e aumenta a disponibilidade de açúcares fermentáveis, aminoácidos e compostos bioativos [11–13]. Entre os cereais com potencial tecnológico destaca-se o centeio (*Secale cereale* L.), cuja composição pode compensar parcialmente as limitações nutricionais do mel [14–16].

1.1 Mel como substrato fermentativo

O mel é definido como uma substância doce natural produzida pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de secreções vegetais e excreções de insetos sugadores, que as abelhas coletam, transformam por meio de enzimas próprias, desidratam e armazenam nos favos até à maturação [17]. A produção global de mel apresenta variações regionais, com a China destacando-se como o principal produtor mundial, enquanto a Europa figura como o segundo maior bloco produtor de mel [18–20]. A Figura 1 ilustra a evolução da produção de mel na União Europeia ao longo dos últimos anos, evidenciando um

crescimento progressivo, com exceção de 2021, quando foi registada uma redução associada aos efeitos da pandemia.

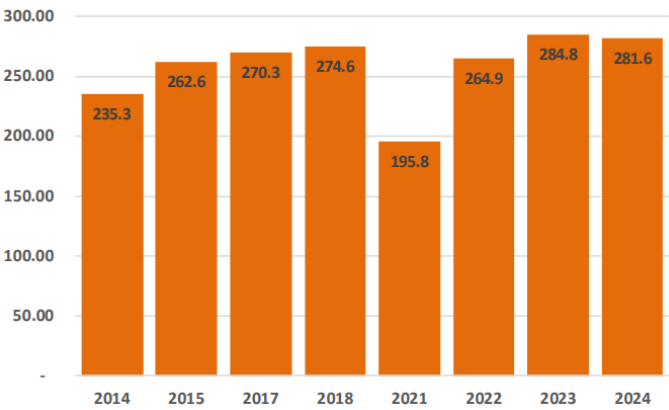


Figura 1 - Produção de mel na União Européia ao decorrer dos anos (anos vs toneladas) [21].

Neste contexto, a diversidade botânica e geográfica dos países europeus contribui para uma ampla variedade de méis regionais, muitos dos quais possuem certificações de origem, reforçando o valor cultural, económico e gastronómico do mel no contexto europeu [22,23].

Os valores de referência dos parâmetros físico-químicos do mel estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de referências dos parâmetros do mel.

Parâmetros	Mel	Referências
	≥ 60 (mel de néctar)	
Açúcares (g/100g)	≥ 45 (mel de melada ou mistura de mel de néctar e mel de melada)	[24]
Umidade (%)	≤ 20%	[24]
Cinzas (%)	0,01 – 1,18	[25]
Acidez total (meq/kg)	≤ 50	[24]
	≤ 0,8 (mel de néctar)	
Condutividade elétrica (mS/cm)	≥ 0,8 (mel de melada ou mistura de mel de néctar e mel de melada)	[24]
pH	3,2 – 6,4	[22,26]
HMF (mg/kg)	≤ 40	[24]

Índice diastásico (Escala de Schade)	≥ 8	[24]
---	----------	------

Do ponto de vista químico, o mel é composto essencialmente por carboidratos simples, com predominância de frutose e glicose. Segundo os critérios de qualidade, o teor total desses dois açúcares deve ser de, no mínimo, 60 g/100 g para mel de néctar e 45 g/100 g para mel de melada e misturas de mel de melada com mel de néctar [24], cuja proporção influencia diretamente características como a cristalização, viscosidade e percepção de doçura [2,22,25,27]. A água é o segundo componente em maior proporção, sendo responsável por valores iguais ou inferiores à 20% do mel. O teor de cinzas representa a fração mineral do mel e varia entre 0,01 - 1,18 %, sendo um indicador relevante da sua qualidade e da origem floral [25]. Ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e compostos aromáticos estão presentes em menor quantidade, mas desempenham funções essenciais na qualidade e funcionalidade do mel [3,22,28].

Os méis podem ser classificados segundo parâmetros botânicos, geográficos e físico-químicos, sendo que a origem floral é frequentemente utilizada como principal critério [6], sendo definida pela análise polínica. A distinção entre méis monoflorais e multiflorais baseia-se na predominância do pólen de uma espécie vegetal específica. A origem botânica determina não apenas o perfil sensorial, mas também a composição química, incluindo a proporção de monossacarídeos, o teor de compostos fenólicos, a condutividade elétrica e a capacidade antioxidante [7,8].

As propriedades físico-químicas do mel, incluindo pH, acidez, condutividade elétrica e atividade enzimática, são essenciais para a sua caracterização e adequação a processos tecnológicos [26]. Alguns desses parâmetros possuem limites máximos e mínimos estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 214/2003 [24], sendo amplamente utilizados como indicadores de qualidade do produto. O pH do mel depende diretamente de sua origem botânica, apresentando valores geralmente entre 3,2 - 6,4 [22,26]. A acidez total, deve permanecer igual ou inferior a 50 meq/kg, enquanto a condutividade elétrica apresenta valores variáveis conforme a origem polínica do mel, para méis de néctar o valor deve ser abaixo de 0,8 mS/cm, e para méis de mistura deve ser no mínimo 0,8 mS/cm [26]. Outro parâmetro importante é o teor de hidroximetilfurfural (HMF), que deve apresentar valores inferiores ou iguais a 40 mg/kg, sendo utilizado como indicador de frescor e de possíveis degradações térmicas do mel [24]. Além disso, o índice

diastásico deve ser maior ou igual a 8 na escala de Schade, refletindo a atividade enzimática do mel e contribuindo para a avaliação da qualidade e do grau de processamento do produto [26].

Adicionalmente, o mel apresenta uma elevada diversidade de compostos bioativos responsáveis por efeitos biológicos associados à sua composição [22]. Os compostos fenólicos, amplamente estudados, conferem cor, estabilidade oxidativa e propriedades antioxidantes. Ácidos fenólicos como ferúlico e cafeico, contribuem para a capacidade antioxidante e para características sensoriais que influenciam a aceitação do produto [29].

Estudos também indicam que méis de coloração mais escura tendem a favorecer o desempenho fermentativo das leveduras devido ao seu maior teor de minerais e ao maior conteúdo de compostos fenólicos, que atuam como cofatores enzimáticos e antioxidantes naturais durante a fermentação [29,30].

Apesar da elevada concentração em açúcares fermentáveis [6,22,31], o potencial fermentativo do mel depende de diversos fatores físico-químicos e nutricionais. A elevada osmolaridade do mel puro dificulta o metabolismo das leveduras, tornando a diluição essencial para reduzir a pressão osmótica e permitir o início da fermentação. Além disso, a frutose, mesmo sendo abundante, é fermentada mais lentamente que a glicose [32–34].

Outro fator crítico é o baixo teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras (YAN), soma de FAN (aminoácidos livres) e NH_4^+ (amônio), que em mostos de mel não suplementados tem sido relatada em valores muito baixos [3,35] os quais são insuficientes para suportar o crescimento celular adequado e uma fermentação eficiente. A deficiência de YAN compromete a síntese de enzimas envolvidas nas vias glicolítica e fermentativa, reduz a taxa de consumo de açúcares e aumenta o risco de fermentações lentas ou interrompidas. Adicionalmente, limita a síntese de compostos de aroma desejáveis e favorece a produção de metabólitos indesejáveis, como sulfureto de hidrogênio e outros compostos sulfurados, que afetam negativamente a qualidade sensorial do hidromel [36].

O nitrogênio assimilável representa um dos nutrientes mais importantes para a *Saccharomyces Cerevisiae*, uma vez que fornece os precursores bioquímicos necessários para o crescimento celular, síntese de proteínas, enzimas e cofatores metabólicos. Nitrogênio assimilável suficiente permite que a levedura forme enzimas envolvidas na glicólise, fermentação alcoólica e síntese de aminoácidos essenciais [37–39].

A literatura indica que concentrações de YAN na faixa de aproximadamente 140 a 300 mgN/L são adequadas para assegurar fermentações completas e estáveis,

promovendo adequada atividade metabólica das leveduras e reduzindo a ocorrência de defeitos sensoriais [5,40]. Dessa forma, a suplementação de nitrogênio em mostos de hidromel constitui uma prática essencial para garantir eficiência fermentativa e qualidade do produto final.

1.2 Centeio como fonte de enriquecimento nutricional

O centeio (*Secale cereale L.*) é um cereal adaptado a regiões de clima temperado, tradicionalmente valorizado pela sua tolerância a solos pobres e pelas suas propriedades nutricionais, que favorecem a sua utilização em alimentos e bebidas fermentadas [41]. Apesar da redução da produção mundial de centeio desde a década de 1960, motivada pela intensificação de outros cereais, o interesse científico sobre o seu valor nutricional e aplicação tecnológica tem aumentado [41]. Conforme a Figura 2, a produção europeia concentra-se sobretudo na Alemanha e na Polónia.

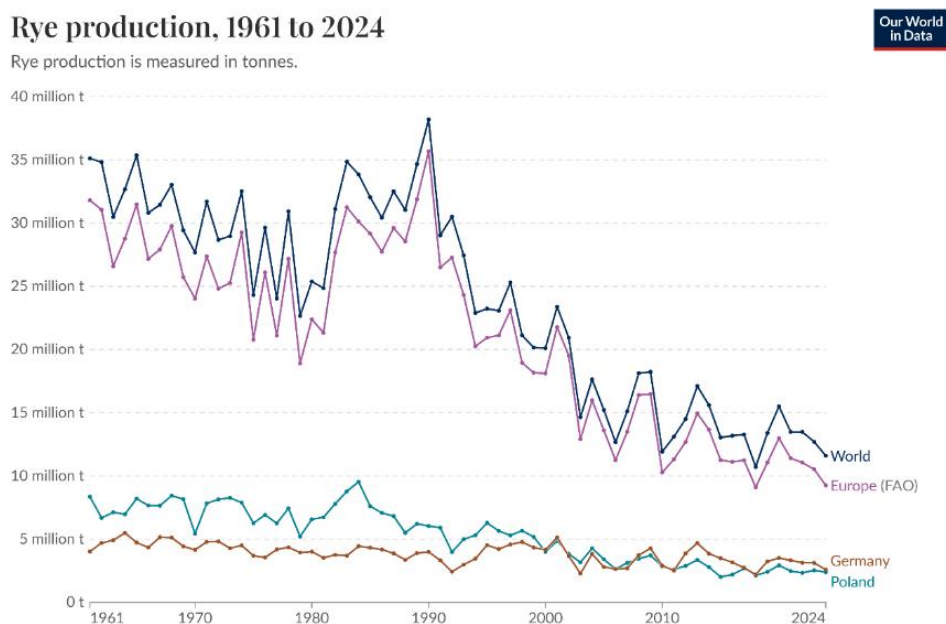


Figura 2 - Produção mundial de centeio e principais produtores na Europa nos períodos de 1961 e 2023 [42].

Conforme apresentado na Tabela 2, a farinha de centeio não maltada apresenta os seguintes parâmetros físico-químicos.

Tabela 2 - Valores de referência dos parâmetros físico-químicos de centeio não maltado.

Parâmetros	Centeio não maltado	Referências
Carboidratos (%)	75-80	[43,44]
Proteínas (%)	8-11	[45-49]
pH	5,6 e 6,2	[13,48]
Gordura Total (%)	2-3	[43]
Umidade (%)	8,2-13,0	[45,50]
Cinzas (%)	1,4-2,2	[45,51]
Sacarose (g/100g)	0,93-1,61	[52,53]
Maltose (g/100g)	0,05-1,02	[52,53]
Glicose (g/100g)	0,06-0,13	[53]
Frutose (g/100g)	0,052-0,08	[53]

Os teores de macronutrientes revelam uma concentração proteica que varia de 8% a 11%, acompanhada por teores mais baixos de gordura total (2 - 3%) e cinzas (1,4 - 2,2%). Já a umidade oscila entre 8,2% e 13,0%. A fração de hidratos de carbono representa a maior parcela da matéria seca do grão, correspondendo a aproximadamente 75 - 80% da sua composição. Esta fração é constituída predominantemente por amido, principal reserva energética do cereal, e por um expressivo teor de fibras alimentares, que giram em torno de 15 - 21% dessa fração [43]. Dentre as fibras, sobressaem as pentosanas, particularmente os arabinoxilanos, macromoléculas responsáveis por conferir alta viscosidade à matriz em processos de hidratação [54].

Apesar da abundância de carboidratos complexos, o perfil de açúcares livres no grão cru é bastante restrito [53]. Os dados evidenciam a predominância da sacarose, com valores de 0,93 a 1,61 g/100 g, ao passo que monossacarídeos como a glicose (0,06 - 0,13 g/100 g) e a frutose (0,052 - 0,08 g/100 g) encontram-se em proporções substancialmente menores. É pertinente observar a concentração de maltose, a qual apresenta valores entre

0,05 a 1,02 g/100 g. Estes números corroboram a dinâmica bioquímica do grão, evidenciando que, antes da ativação enzimática promovida pela malteação, a maltose encontra-se em níveis reduzidos. Apenas a partir da degradação hidrolítica do amido armazenado é que este dissacarídeo terá um aumento expressivo, junto com o aumento de monossacarídeos como a glicose e a frutose [15].

Além disso, o centeio contém compostos fenólicos, com destaque para ácidos fenólicos como ácido ferúlico, p-cumárico, sinápico e vanílico, além de flavonoides e lignanas, concentrados principalmente nas partes externas do grão (farelo) [55]. Em farinhas integrais de centeio, a capacidade antioxidante tende a ser significativamente maior do que em farinhas refinadas, refletindo a influência da estrutura anatômica do grão na retenção de compostos bioativos [46]. Estas propriedades antioxidantes estão associadas a potenciais benefícios à saúde, incluindo efeitos protetores contra stress oxidativo e alguns processos inflamatórios [46,55,56].

Do ponto de vista nutricional, o centeio apresenta uma composição relevante em proteínas, vitaminas do complexo B, minerais e compostos bioativos, características que o tornam um ingrediente de interesse para a melhoria da qualidade nutricional de produtos fermentados [54]. Nesse contexto, sua incorporação em formulações fermentativas pode representar uma alternativa promissora para o fornecimento de nutrientes complementares ao processo, incluindo compostos nitrogenados, minerais e precursores metabólicos importantes para a atividade das leveduras [5,57].

Além disso, sua composição pode favorecer o enriquecimento nutricional e sensorial da bebida final, pela presença de compostos bioativos e de compostos capazes de influenciar o metabolismo fermentativo. Contudo, esses efeitos tendem a ser potencializados quando o grão é submetido à malteação [58].

1.3 Malteação como estratégia de melhoria fermentativa

A malteação é um processo biotecnológico que tem como objetivo transformar grãos crus em matérias-primas mais acessíveis nutricionalmente, enzimaticamente ativas e tecnologicamente adaptadas a processos fermentativos [16,59]. Embora tradicionalmente associada à produção de cerveja, a malteação tem aplicações mais amplas, sendo explorada como estratégia de bioprocessamento para melhorar a

fermentabilidade de substratos e reforçar a complexidade sensorial de bebidas fermentadas, como o hidromel [50,53,60].

O processo de malteação envolve etapas controladas de hidratação (maceração), germinação e secagem. Durante estas fases, as reservas de carboidratos, proteínas e lípidos são parcialmente degradadas e mobilizadas, tornando-se mais solúveis e acessíveis à atividade enzimática das leveduras durante a fermentação subsequente [16,53,59]. A ativação de enzimas endógenas, como amilases, proteases, β -glucanases e fitases, resulta no aumento da fração solúvel de açúcares fermentáveis, aminoácidos livres e peptídeos, componentes essenciais para o metabolismo fermentativo, melhoria da cinética fermentativa e expressão sensorial da bebida final [50].

A maceração, etapa inicial da malteação, consiste na imersão dos grãos secos em água, promovendo o aumento do teor de umidade de aproximadamente 10 a 14 % para 44 a 48 % [15,61,62]. Este aumento de umidade ativa a respiração celular e o metabolismo enzimático, estimulando a síntese de giberelinas e ativando sistemas hidrolíticos essenciais à degradação subsequente do endosperma [61,63].

Na etapa de germinação, o grão rompe o estado de dormência e desencadeia intensa atividade metabólica e enzimática. Esta fase, conduzida sob condições controladas de temperatura ($\approx 15\text{--}20^\circ\text{C}$) e elevada umidade, promove a síntese e ativação de enzimas amilolíticas que degradam o amido em açúcares simples e dextrinas fermentáveis [61,63–66]. Paralelamente, as proteases hidrolisam proteínas estruturais em aminoácidos livres e peptídeos, aumentando significativamente o teor de nitrogênio assimilável, essencial para o crescimento e viabilidade das leveduras durante a fermentação alcoólica [50,53,64]. As β -glucanases degradam componentes da parede celular, aumentando a solubilidade da matriz cerealífera e facilitando a liberação de nutrientes e compostos bioativos [61,64]. O tempo de germinação é um parâmetro crítico e, em geral, o processo é interrompido antes que a radícula ultrapasse cerca de três quartos do comprimento do grão, evitando perdas excessivas de constituintes nutricionais [50,63].

Posteriormente, a secagem tem como objetivo interromper a germinação, reduzir o teor de umidade para valores próximos a 6 % e garantir a estabilidade microbiológica do malte. Durante esta etapa, a temperatura aplicada influencia tanto a preservação da atividade enzimática residual quanto o desenvolvimento de compostos aromáticos através de reações de Maillard e outras transformações térmicas (70,74).

Como resultado dessas etapas ocorrem alterações bioquímicas profundas que transformam o grão numa matriz fermentável eficiente. A degradação do amido pela ação

coordenada das enzimas α - e β -amilases converte este polissacarídeo de reserva em moléculas menores, culminando na libertação expressiva de maltose [14,66].

Simultaneamente, a proteólise conduzida por enzimas endógenas liberta aminoácidos e peptídeos que enriquecem o mosto em nitrogênio assimilável, favorecendo a síntese proteica das leveduras, a atividade enzimática e a formação de metabólitos secundários responsáveis por atributos sensoriais desejáveis [12,67,68]. Também ocorre a degradação das paredes celulares melhora ainda a biodisponibilidade de minerais, enquanto transformações lipídicas podem afetar o perfil de ácidos gordos e a formação de compostos voláteis durante a fermentação [11]. A malteação tem também sido associada ao aumento da fração de compostos fenólicos solúveis e da capacidade antioxidante do cereal [64].

1.4 Hidromel: produção e características

O hidromel é uma bebida fermentada tradicional produzida pela fermentação alcoólica de mostos à base de mel diluído em água, sendo esta fermentação conduzida principalmente por leveduras do gênero *Saccharomyces* [4,67]. Durante este processo, as leveduras consomem os açúcares presentes no mosto, convertendo-os principalmente em etanol e dióxido de carbono, além da formação de metabólitos secundários como glicerol e ácidos orgânicos, nomeadamente ácido acético. A sua composição, depende fortemente das matérias-primas utilizadas e das condições do processo fermentativo, o que tem motivado crescente interesse acadêmico e industrial para otimização tecnológica e valorização sensorial [2,69].

A evolução recente do mercado internacional de bebidas fermentadas, particularmente das classificadas sob o código HS 2206 (Sistema Harmonizado), o qual é usado no sistema internacional padrão para categorizar mercadorias que são importadas ou exportadas, no que inclui o hidromel, a sidra e a perada, evidencia uma cadeia produtiva em clara expansão e crescente globalização.

Conforme evidenciado na Figura 3, os principais exportadores de bebidas fermentadas classificadas no HS 2206, concentram-se na Europa, bem como na América do Norte, representada por Estados Unidos e Canadá. Em contrapartida, os principais importadores, incluem os Estados Unidos e o Canadá, além de mercados localizados na Ásia e na África do Sul.

Principais Fluxos de Comércio de Bebidas Fermentadas (HS 2206) em 2023

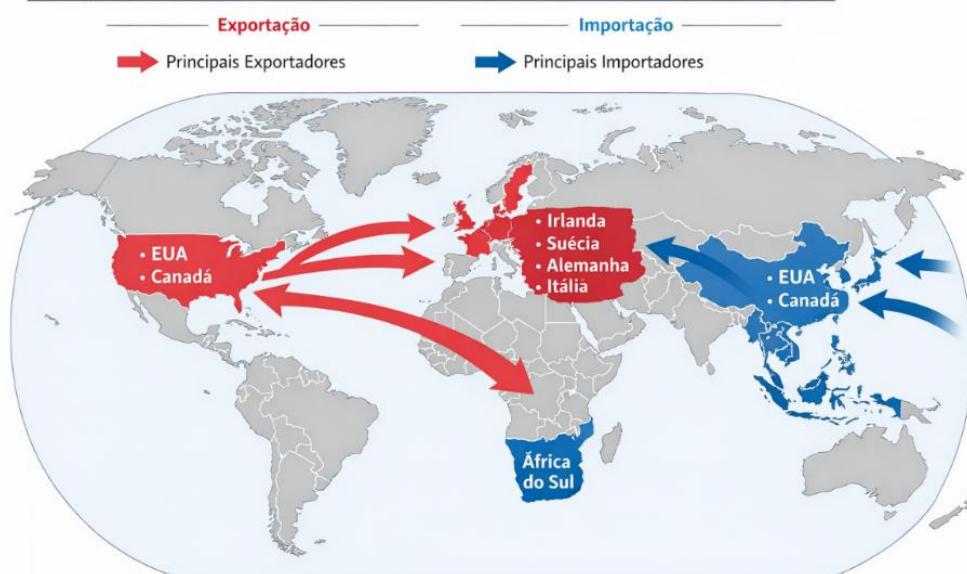


Figura 3 - Principais exportadores e importadores globais de bebidas fermentadas (HS 2206) em 2023, respectivamente [70].

Os fluxos representados no mapa (Figura 3) demonstram que a Europa se destaca como importante polo exportador, direcionando suas exportações principalmente para a América do Norte, Ásia e África do Sul, enquanto os Estados Unidos e o Canadá figuram simultaneamente como exportadores e importadores relevantes no comércio internacional dessas bebidas em 2023.

Estes dados confirmam a relevância econômica e comercial crescente do hidromel e de outras bebidas fermentadas, reforçando a necessidade de investigação aplicada para a padronização dos processos, a melhoria da qualidade e o reforço da competitividade internacional destes produtos.

Em relação a produção do hidromel, etapas cruciais influenciam diretamente a fermentação, a estabilidade e as características sensoriais da bebida [71–73]. Como apresentado no fluxograma da Figura 4, o processo de produção inicia-se com a diluição do mel em água, até atingir a concentração de açúcares desejada, frequentemente expressa em °Brix, ajustada ao teor alcoólico alvo [5].



Figura 4 - Fluxograma do processo de produção do hidromel (adaptado de [67]) .

Em seguida, realiza-se a suplementação nutricional do mosto, necessária devido ao baixo teor de nutrientes presentes no mel. Posteriormente, é efetuada a correção do pH, geralmente para valores entre 3,5 e 4,0, com o objetivo de favorecer o desenvolvimento das leveduras fermentativas e reduzir o crescimento de microrganismos contaminantes. Após esse ajuste, adiciona-se dióxido de enxofre (SO₂), utilizado como agente antimicrobiano, auxiliando no controle microbiológico do mosto e prevenindo reações oxidativas indesejáveis que podem comprometer a qualidade da bebida. Em seguida, o mosto é pasteurizado e posteriormente inoculado com estirpes selecionadas, majoritariamente *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a fermentação conduzida sob condições controladas de temperatura e aeração [5,74,75].

Concluída a fermentação ativa, o hidromel passa por etapas de clarificação e maturação, que contribuem para a limpidez, estabilidade microbiológica e otimização do perfil sensorial [10,35]

A composição química da bebida obtida nesse processo, resulta da interação entre os componentes naturais do mel e os metabólitos formados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica. A bebida final inclui etanol, açúcares residuais, ácidos orgânicos, compostos voláteis aromáticos, minerais, vitaminas e diferentes grupos de compostos fenólicos, todos os quais influenciam o perfil sensorial e bioativo da bebida [3].

Em termos de propriedades físico-químicas, o pH do hidromel tende a diminuir à medida que a fermentação avança, embora as diferenças entre o mosto e o produto final sejam geralmente pequenas. Estudos reportam faixas de pH entre aproximadamente 2,7 e 4,3 em diversos tipos de hidromel, dependendo da composição do mosto e das condições fermentativas aplicadas. Também nota-se que a densidade do mosto diminui à medida que os açúcares são consumidos, sendo um dos principais parâmetros de controle da fermentação. A turbidez, por sua vez, tende a reduzir-se após processos de clarificação e maturação, influenciando diretamente a aparência final da bebida [10,76].

Em relação aos compostos fenólicos presentes no mel, esses são parcialmente transferidos para o hidromel durante a fermentação, conferindo-lhe capacidade antioxidante [74]. Hidroméis produzidos com méis de cor escura tendem a apresentar maior teor fenólico e maior capacidade antioxidante, traduzindo-se em estabilidade oxidativa superior e possível benefício antioxidante [29].

Portanto, no contexto da produção de hidromel, a malteação do centeio surge como uma estratégia eficaz para corrigir as limitações nutricionais do mel, nomeadamente a baixa disponibilidade de nitrogênio assimilável e minerais essenciais ao metabolismo fermentativo das leveduras [4,53,59]. A incorporação de malte de centeio no mosto de mel diluído pode aumentar a fermentabilidade, promover fermentações mais vigorosas e estáveis, reduzir a necessidade de suplementação externa e contribuir para um perfil sensorial mais complexo e equilibrado [9,50,67,77].

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial tecnológico e bioativo do centeio ibérico maltado como ingrediente de enriquecimento na produção de hidromel, analisando o efeito de diferentes níveis de adição sobre a cinética fermentativa e nas características físico-químicas da bebida final.

1.5.2 Objetivos específicos

- Realizar a malteação laboratorial controlada do grão de centeio ibérico, seguida da obtenção da farinha maltada para utilização como suplemento nutricional na produção de hidromel;
- Caracterizar o mel e as farinhas de centeio (maltado e não maltado) a nível físico-químico;
- Determinar o teor de compostos antioxidantes e nitrogênio assimilável nas farinhas de centeio;
- Formular mostos suplementados com diferentes percentagens de farinha de centeio maltado (1%, 2% e 5%);
- Avaliar o efeito da suplementação com farinha de centeio maltado sobre a cinética fermentativa, o consumo de açúcares, a produção de etanol e os principais parâmetros físico-químicos dos hidroméis obtidos;
- Determinar o impacto da incorporação de farinha de centeio maltado no teor de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante do hidromel.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização polínica e físico-química do mel

Foi utilizado o mel escuro do Parque de Montesinho produzido no ano de 2023, adquirido de um produtor local da região norte de Portugal (Figura 5). Antes da preparação do mosto, foram realizadas análises no mel, para confirmar as características e a garantir a qualidade satisfatória exigida pelos limites da legislação portuguesa [24]. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicado.



Figura 5 - Mel do Parque de Montesinho Denominação de Origem Protegida.

2.1.1 Análise Polínica

A determinação da origem botânica do mel foi realizada por análise polínica, com base na identificação microscópica dos grãos de pólen presentes na amostra [78,79]. Inicialmente, foram pesados 10 gramas de mel, aos quais se adicionou 11 mL de água acidificada com ácido sulfúrico (H_2SO_4 5%, v/v). A mistura foi submetida a banho-maria a 40°C até completa dissolução.

Posteriormente, a solução foi distribuída em dois tubos de centrifugação, assegurando a transferência quantitativa da amostra com lavagens adicionais do recipiente original.

As amostras foram centrifugadas a 2600 rpm durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido deixando aproximadamente 1 mL de volume residual.

O sedimento foi então reunido num único tubo e o volume ajustado para cerca de 10 mL com água desionizada, promovendo a homogeneização da suspensão. As preparações foram posteriormente centrifugadas a 2600 rpm durante 5 minutos para

concentração adicional dos grãos de pólen, sendo o sobrenadante removido até volume inferior a 1 mL. O sedimento foi deixado em água glicerinada (1:1 v/v) durante 24 horas.

Uma alíquota de 10 µL da suspensão foi colocada numa lâmina de microscopia, em duplicado, em gelatina. A identificação dos grãos de pólen foi realizada por observação microscópica, com base em características morfológicas e comparação com atlas polínicos e literatura especializada.

2.1.2 Hidroximetilfurfural

O teor de HMF do mel foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico descrito em Anônimo [80]. Dissolveram-se 5 gramas de mel em 25 mL de água desionizada e transferiram-se para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram adicionados 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II e fez-se o volume com água desionizada. Após filtrar esta solução, os primeiros 10 mL de filtrado foram rejeitados e recolheram-se alíquotas de 5 mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionaram-se 5 mL de água desionizada (solução amostra) e ao outro 5 mL de solução bissulfito de sódio 0,2% (solução referência). Leu-se a absorvância das soluções a 284 e 336 nm num espectrofotômetro UV-visível (VWR, modelo UV-3100PC). O resultado deve ser expresso em mg de hidrometilfurfural por kilograma de mel, seguindo a Equação (1).

$$\text{HMF} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = (\text{Abs } 284 - \text{Abs } 336) \times 149,7 \times \left(\frac{5}{\text{g amostra}} \right) \quad (1)$$

2.1.3 Índice diastásico

A atividade diastásica foi determinada através de um método baseado na hidrólise de substrato Amylazyme (Megazyme) [81]. Inicialmente, as amostras foram preparadas por dissolução de 2 gramas de mel em 40 mL de tampão maleato de sódio (pH 5,6; 0,1 M), contendo cloreto de cálcio (0,05 M), sendo posteriormente transferido para balão de 50 mL e volume ajustado com o mesmo tampão.

Para a análise, foi transferido 1 mL da solução de mel para tubos de ensaio, procedendo-se a uma pré-incubação a 40°C durante 5 minutos. De seguida, foi adicionada uma pastilha de Amylazyme, sem retirar o tubo de ensaio do banho-maria, deixou-se incubar por mais 10 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de

10 mL de solução Trizma base (pH 8,5; 0,2 M). Os tubos foram então agitados vigorosamente em vortex e deixados em repouso durante 5 minutos.

Posteriormente, as amostras foram novamente agitadas e filtradas (papel Whatman), sendo a absorbância medida a 590 nm num espectrofotômetro. O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento, substituindo a amostra de mel pelo tampão.

O resultado foi obtido através da Equação (2) e expressos em unidades Schade por grama de mel.

$$ID \text{ (Índice diastásico)} = 20 \times Abs \quad (2)$$

2.1.4 Acidez total

A acidez total foi determinada segundo o método oficial AOAC 962.19 [82]. Dissolveram-se 10 gramas de mel em 75 mL de água desionizada. 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 acidez total (miliequivalentes de ácido por Kg) foi determinada usando a Equação (3).

$$\text{Acidez total} \left(\frac{\text{meq}}{\text{Kg}} \right) = V_{\text{NaOH}} \times 10 \quad (3)$$

Onde:

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

2.1.5 pH

O pH do mel foi medido usando o método descrito por Bogdanov *et al.* [83]. Para isso, pesaram-se 10 gramas da amostra, que foram diluídos em 75 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada com o auxílio de um agitador magnético e, em seguida, o eletrodo do medidor de pH foi imerso na mistura para a leitura do valor correspondente.

2.1.6 Umidade

O conteúdo de água do mel foi determinado de acordo com o método refratométrico descrito em Anônimo [80]. A amostra de mel foi homogeneizada e a leitura foi feita com um refratômetro. Os resultados expressam-se em % (m/m).

2.1.7 Cinzas

O teor de cinzas do mel foi determinado por condutivimetria, de acordo com a metodologia descrita por Sancho *et al.* [84]. Após a medição da condutividade elétrica, procedeu-se à interpretação dos resultados conforme o intervalo obtido. Quando o valor foi inferior a $0,9 \times 10^{-3}$ S/cm, este foi convertido para 10^{-4} S/cm e o respectivo teor de cinzas foi estimado com base na tabela de correspondência apresentada por Sancho *et al.* [84].

Por outro lado, quando a condutividade elétrica apresentou valores superiores a $0,9 \times 10^{-3}$ S/cm, a percentagem de cinzas totais foi calculada recorrendo à Equação (4) proposta pelos mesmos autores.

$$\% \text{ Cinzas totais} = 0,083 \times (\text{Condutividade} - 0,092) \quad (4)$$

2.1.8 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Sancho *et al.* [84]. Inicialmente, foram pesados 10 gramas da amostra, que foram posteriormente dissolvidos em 75 mL de água desionizada.

Em seguida, a medição da condutividade elétrica foi realizada utilizando um condutivímetro previamente calibrado. O valor registado foi multiplicado por 1,5, sendo os resultados expressos em mS/cm (10^{-3} S/cm).

2.1.9 Açúcares redutores

A determinação do teor de açúcares foi realizada pelo método de Lane-Eynon, fundamentado na redução do licor de Fehling por açúcares redutores em ebulição, utilizando o azul de metileno como indicador de ponto final [83]. Para a análise, pesaram-

se 2 gramas de mel , que foram dissolvidos em balão volumétrico de 200 mL com água desionizada. Desta solução de mel, retirou-se uma alíquota de 50 mL, que foi transferida para um balão de 100 mL e completada com água desionizada, obtendo-se a solução diluída de mel para a titulação.

O procedimento iniciou-se com uma titulação preliminar para determinar o volume de água necessário para manter a reação a volume constante. Em um béquer de 250 mL, pipetaram-se 10 mL de solução A e 10 mL de solução B de Fehling, adicionando-se 7 mL de água desionizada e 14 mL da solução diluída de mel contida na bureta. A mistura foi aquecida até a ebulição por 2 minutos, seguida da adição de 1 mL de azul de metileno e titulação rápida até a descoloração do indicador.

Para a titulação definitiva, empregaram-se as mesmas quantidades das soluções de Fehling A e B utilizadas na titulação preliminar, bem como um volume de água de compensação, calculado pela diferença entre 25 mL e o volume consumido na etapa preliminar. Posteriormente, adicionaram-se 12,5 mL da solução de mel previamente diluída, contida na bureta. A mistura reacional foi aquecida até a ebulição por 2 minutos, seguida da adição de 1 mL de azul de metileno, procedendo-se, em seguida, à titulação rápida até a completa descoloração do indicador no sobrenadante. O teor de açúcares foi expresso em porcentagem (g/100g) através da Equação (5).

$$C = \frac{2000}{P \times V} \quad (5)$$

Onde:

C- gramas de açúcar invertido por 100 gramas de mel;

P- peso da amostra de mel (g);

V- volume da solução diluída de mel gasto na titulação definitiva (mL).

2.2 Caracterização físico-química do centeio ibérico

As análises de proteínas (n=2), lipídios totais (n=2), umidade (n=3), cinzas (n=3), carboidratos totais (n=2) e açúcares solúveis (n=3) a seguir foram efetuadas nas amostras de centeio ibérico maltado e não maltado.

2.2.1 Proteínas

A determinação do teor de proteína bruta nas amostras foi realizada por meio do método de Kjeldahl, conforme descrito pelo método oficial da AOAC 950.36 [82], o qual se baseia em três etapas principais: digestão, destilação e titulação. Para a digestão, pesou-se 1 grama de amostra em uma balança analítica (Kern ADB). A amostra foi transferida para um tubo de digestão (Kjeldahl), onde foram adicionadas duas pastilhas catalisadoras (compostas por 99,9% de K_2SO_4 e 0,1% de Se) e 12 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após homogeneização para garantir contato total entre os reagentes, os tubos foram aquecidos em bloco digestor (modelo DK 8 – Heating Digester) a 420°C durante 60 minutos.

Depois de finalizado o processo de digestão, os tubos foram deixados em repouso por cerca de duas horas para resfriamento. Em seguida, deu-se início à etapa de destilação no equipamento Velp científica- UDK 139: adicionou-se hidróxido de sódio para neutralizar o ácido sulfúrico excedente e gerar vapor de água, liberando amoníaco. Esse amoníaco foi absorvido previamente em solução de ácido bórico contendo aproximadamente 10 gotas do indicador Tashiro.

Na etapa final, procedeu-se à titulação do amoníaco com solução de HCl 0,2 M até que a mudança de cor indicasse visualmente o ponto final da reação. Em seguida, a porcentagem de azoto presente nas amostras foi calculada com base no volume gasto na titulação e na concentração da solução de HCl utilizada, conforme apresentado na Equação (6). Esse cálculo constituiu uma etapa fundamental para a posterior determinação do teor de proteína.

$$\%azoto = \frac{V \times [HCl] \times 0,014}{m} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

V- volume gasto na titulação

m- massa inicial da amostra

Após realizar o cálculo de %azoto é necessário utilizar a Equação (7) para o cálculo de %Proteína:

$$\%Proteína = \%azoto \times \text{fator de conversão} \quad (7)$$

Segundo o manual do equipamento utilizado para a destilação, o fator de conversão para o centeio é de 6,25.

2.2.2 Lipídios totais

A determinação do teor de gordura total nas amostras de farinhas foi realizada segundo o método AOAC 920.85 [82], baseado na extração por Soxhlet (modelo Behrotest), utilizando hexano como solvente. Aproximadamente 2 gramas de amostra foram pesadas e inseridas em um cartucho próprio para o extrator. O cartucho foi colocado no sistema Soxhlet e acoplado a um balão de fundo plano previamente seco em estufa a 105°C e pesado. Foram adicionados 170 mL de hexano, e o sistema foi montado com condensador e submetido a aquecimento para promover a extração contínua durante 6 horas.

Após esse período, o cartucho foi removido e o solvente recuperado por destilação. O extrato lipídico foi então concentrado em rotaevaporador (IKA RV 8) a 50°C por aproximadamente 10 minutos para remoção do solvente residual. Posteriormente, os balões foram colocados em estufa a 105°C para assegurar a completa eliminação de solvente, resfriados em dessecador e pesados. A porcentagem de gordura foi calculada com base na Equação (8).

$$\%gordura = \frac{mf - mi}{ma} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

mf- massa final do balão com a amostra (g);

mi- massa inicial do balão vazio (g);

ma- massa da amostra inicialmente pesada (g);

2.2.3 Umidade - Matéria seca

A determinação da umidade das amostras foi realizada por meio do método de secagem em estufa a 105°C, utilizando equipamento da marca Memmert, procedimento que consiste na evaporação da água presente na amostra por aquecimento controlado.

Antes da análise, os cadinhos foram colocados na estufa por uma hora a 105°C, depois transferidos para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e, então, pesados para registro da massa do cadinho vazio. Em seguida, aproximadamente 2 gramas

de cada amostra foram pesadas em uma balança analítica (Kern ADB) e transferidas para os respectivos cadinhos previamente identificados.

As amostras foram mantidas na estufa até peso constante. Ao término da secagem, os cadinhos foram novamente colocados no dessecador até atingirem peso constante, sendo então registrada a massa final. A porcentagem de umidade foi calculada utilizando a Equação (9).

$$\%umidade = \frac{m_i - m_f}{m_i - m_c} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

m_i - massa inicial do cadinho com a amostra (g);

m_f - massa do cadinho com a amostra após secagem (g);

m_c - massa do cadinho vazio (g).

2.2.4 Cinzas

A análise do teor de cinzas e do resíduo mineral das amostras foi realizada conforme o método oficial no 923.03 da AOAC [85]. Primeiramente, cadinhos vazios foram secos em estufa a 105°C por uma hora, resfriados em dessecador e pesados para obter a massa. Em seguida, aproximadamente 1 grama de cada amostra foi colocado em cadinhos identificados, registrando-se a massa inicial. Os cadinhos foram incinerados em mufla a 550°C por 8 horas para combustão da matéria orgânica. Após a incineração, foram transferidos para o dessecador, resfriados até temperatura ambiente e pesados novamente para obter a massa final. A porcentagem de cinzas foi calculada pela Equação (10).

$$\%cinzas = \frac{m_f - m_c}{m_i - m_c} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

m_f - massa do cadinho com a amostra incinerada (g);

m_i - massa inicial do cadinho com a amostra (g);

m_c - massa do cadinho vazio (g).

2.2.5 Carboidratos totais

A determinação dos carboidratos totais foi realizada por cálculo indireto, pelo método da diferença, conforme descrito pela FAO [86]. Para isso, subtraiu-se de 100% o somatório das porcentagens de umidade, cinzas, lipídios totais e proteína bruta previamente determinadas.

$$\% \text{Carboidratos} = 100 - (\text{Umidade}(\%) + \text{Cinzas}(\%) + \text{Proteínas}(\%) + \text{Lipídios}(\%)) \quad (11)$$

2.2.6 Açúcares solúveis

A extração e quantificação de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose + maltose) nas amostras de farinha maltada e não maltada foram realizadas por extração aquosa assistida por ultrassom, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com o método descrito por Klupsaite *et al.* [52], com algumas modificações. Aproximadamente 2 gramas de cada amostra foram pesadas e transferidas para sacos Stomacher, aos quais foram adicionados 10 mL de água desionizada. As amostras foram submetidas à sonicação por 5 min, visando promover a solubilização dos açúcares presentes na matriz. Em seguida, procedeu-se à homogeneização em Stomacher por 60 segundos.

Posteriormente, alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante foram submetidas à centrifugação (Eppendorf® Centrifuge 5702 RG) a 5000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado através de filtros de membrana com porosidade de 0,22 µm (Whatman®, EUA) para remoção de partículas em suspensão e transferido para microtubos tipo Eppendorf, sendo posteriormente armazenado sob congelamento até o momento da análise cromatográfica.

A determinação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna Supelcogel H (Supelco, EUA) com dimensões de 30 cm × 7,8 mm. Foi utilizada a solução aquosa de ácido fórmico 0,1 M como fase móvel, com fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 0,2 µL, com tempo total de corrida de 30 minutos, mantendo-se a temperatura da coluna a 30°C. A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas por meio da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos picos cromatográficos com aqueles obtidos a partir de curvas analíticas

preparadas com padrões de glicose (0,4 - 10,02 g/L), frutose (0,4 - 8,11 g/L) e sacarose+maltose (0,20 - 10,07 g/L).

2.3 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante

2.3.1 Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos das farinhas de centeio foi realizada conforme descrito por Makhoul *et al.* [87], com algumas modificações. Aproximadamente 5 g de amostras homogeneizadas foram adicionadas a 50 mL de solução etanol/água (70:30, v/v), sendo a mistura submetida a tratamento ultrassônico por 35 minutos à temperatura ambiente. Após a filtração em papel de filtro Whatman, os extratos foram empregados nas análises subsequentes.

A preparação das amostras de hidromel final para a quantificação de compostos fenólicos consistiu em uma diluição direta, dispensando etapas prévias de extração em fase sólida ou líquida. Seguindo metodologia adaptada de Socha *et al.* [88], o hidromel foi diluído em água desionizada numa proporção de 1:25 (v/v). Este procedimento visou ajustar a concentração de analitos aos limites de linearidade para as leituras espectrofotométricas subsequentes, garantindo que a absorvância se mantivesse dentro da curva de calibração.

2.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos presentes no centeio e no produto final foram determinados segundo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, proposto por Shaghani *et al.* [89] e com pequenas alterações feitas por Paula *et al.* [90]. 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.

Inicialmente, foram pipetados 0,5 mL de amostra diluída, aos quais se adicionaram 2,4 mL de água desionizada, 2 mL de solução de carbonato de sódio a 2% (Na_2CO_3) e 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. As amostras permaneceram em repouso no escuro durante 60 minutos, e, em seguida, a leitura da absorvância foi

realizada a 750 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 (180 - 700 mg/L).

2.3.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP

Para avaliar o poder redutor férrico (FRAP), optou-se pela metodologia descrita por Berker *et al.* [91]. O reagente FRAP foi preparado misturando-se uma solução de tampão acetato de sódio tri-hidratado (0,3M; CH₃COONa . 3H₂O) em pH 3,6 (ajustado com ácido acético), uma solução de TPTZ (1,0 x 10⁻²M) dissolvida em etanol 96%, e uma solução de cloreto férrico hexa-hidratado (2,0 x 10⁻²M; FeCl₃ . 6H₂O), na proporção de 10:1:1 (v/v/v), respectivamente.

Para a análise, uma alíquota de 0,1 mL da amostra foi misturada a 3 mL do reagente FRAP e 0,3 mL de água desionizada. A mistura foi homogeneizada e, após 6 minutos de incubação no escuro, a absorbância foi medida em 595 nm no espectrofotômetro. A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração preparada com o padrão de sulfato de ferro (FeSO₄ . 7H₂O; 25 - 400 mg/L). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ferro II por grama de amostra (mg EFeII/g).

2.3.4 Redução do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método do radical DPPH [90]. Uma alíquota de 0,3 mL do extrato da amostra foi misturada a 2,7 mL de solução de DPPH (2,0 x 10⁻⁴ M). As misturas foram mantidas em repouso no escuro, à temperatura ambiente, por 60 minutos. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm.

O efeito inibitório do DPPH foi calculado a partir do percentual de descoloração do radical, utilizando a Equação (12).

$$\% \text{inibição} = \left[\frac{(ADPPH - AS)}{ADPPH} \right] \times 100 \quad (12)$$

Onde:

ADPPH- absorbância da solução controle de DPPH;

AS- absorbância da solução contendo a amostra.

A quantificação foi realizada por comparação com uma curva de calibração preparada com padrão de Trolox (12,8 - 128 mg/L), com os resultados expressos em equivalente de Trolox por grama de amostra (mg ETrolox/g).

2.4 Processo de malteação do centeio

A malteação seguiu Calvi *et al.* [16], com quatro ciclos de hidratação e aeração (fase úmida e seca). A Figura 6 demonstra o processo de malteação utilizado e suas respectivas condições.

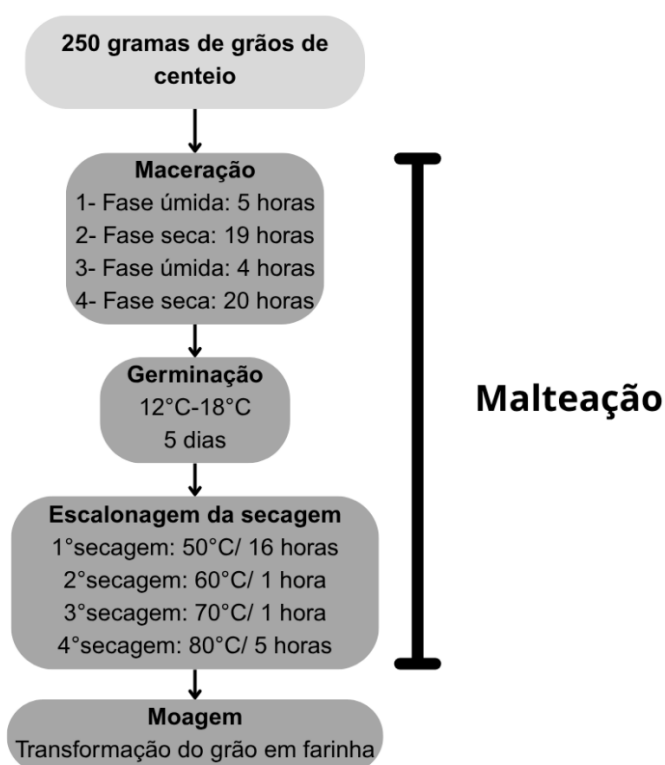


Figura 6 - Fluxograma do processo de malteação do centeio (adaptado de [16]).

Neste estudo, a expressão centeio maltado refere-se ao grão de centeio que passou por maceração, germinação, secagem controlada e moagem para transformação em farinha.

A eficiência da malteação foi avaliada por meio de observações visuais do início da germinação, considerando o surgimento de radículas como indicador da ativação fisiológica dos grãos, bem como pela monitorização do teor de umidade durante a etapa de maceração. A umidade foi acompanhada por pesagens sucessivas dos grãos ao longo dos ciclos de hidratação, tendo como referência os valores recomendados na literatura para a ativação da germinação. A combinação entre o aparecimento de radículas e o aumento do teor de umidade foi utilizada para verificar a eficácia do processo de malteação.

2.5 Matérias-primas e Aditivos Fermentativos

2.5.1 Água

A água utilizada no preparo dos mostos foi água mineral natural, adquirida em comércio local. Devido à ausência de cloro residual e à presença de minerais dissolvidos naturalmente, esta água não interfere negativamente no metabolismo das leveduras e pode contribuir positivamente para o desempenho fermentativo.

2.5.2 Levedura

A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN QA23™ seca (Figura 7). Antes da inoculação, a levedura foi reidratada conforme as instruções do fabricante, garantindo alta viabilidade celular e início homogêneo da fermentação.

A escolha de utilização dessa estirpe deu-se pois a *Saccharomyces cerevisiae* QA23 é amplamente reportada na literatura enológica pela sua elevada eficiência fermentativa e desempenho em condições de mosto com diferentes disponibilidades de azoto, além de sua influência positiva na modulação do perfil aromático do vinho [92].

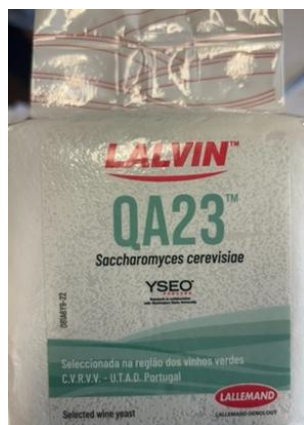


Figura 7 - Levedura utilizada na fermentação do hidromel.

2.5.3 Nutriente comercial

O nutriente comercial ENOVIT (AEB) (Figura 8) foi utilizado para complementar o mosto, fornecendo nitrogênio assimilável e vitaminas essenciais para a levedura. O produto é composto principalmente por fosfato de amónio, sulfato de amónio e tiamina (vitamina B1).



Figura 8 - Nutriente comercial utilizado para complementar o mosto.

2.5.4 Centeio Ibérico

Os grãos de centeio ibérico (*Secale cereale* L.) utilizados neste estudo foram obtidos por meio do projeto CERTRA, provenientes de produtores locais da cidade de Bragança, Portugal. Após a obtenção, os grãos foram armazenados em local seco e protegido da luz até à realização do processo de malteação e das análises físico-químicas.

2.6 Preparação dos mostos para a fermentação

Para obter uma bebida alcoólica com aproximadamente 11% de etanol, o mel foi diluído com água mineral natural até atingir a homogeneização e 23°Brix, valor escolhido para equilibrar açúcares fermentáveis e corpo da bebida. Em seguida, o centeio maltado foi adicionado nas seguintes proporções 1%, 2% e 5% (m/v). Para comparação, foi também preparada uma amostra controle sem adição de centeio, mas com suplementação nutricional padrão (ENOVIT®), de modo a manter o teor de nitrogênio assimilável e pH. Essas concentrações foram selecionadas de forma a avaliar o efeito de diferentes níveis de suplementação sobre a cinética fermentativa e as características do hidromel. A concentração máxima foi limitada a 5%, considerando que teores mais elevados poderiam aumentar excessivamente a viscosidade do mosto em função do elevado conteúdo de fibras do centeio. Esse aumento de viscosidade poderia dificultar a homogeneização do meio e comprometer o desempenho fermentativo das leveduras, influenciando a interpretação dos efeitos da suplementação.

Posteriormente, o nitrogênio assimilável foi quantificado pelo método do formaldeído [93], antes da adição do ENOVIT®, com o objetivo de verificar a contribuição do centeio maltado nesse parâmetro. Com base nessa quantificação inicial e no valor experimental de que 0,6 g/L de ENOVIT® fornecem 140 mgN/L de YAN, os mostos foram suplementados com ENOVIT® de forma ajustada, visando atingir o teor desejado de 200 mgN/L. Após a suplementação, foi realizada uma segunda aferição do nitrogênio assimilável, a fim de confirmar que a adição de ENOVIT® permitiu alcançar o teor previamente estabelecido para os mostos.

Após isso, procedeu-se com a adição de dióxido de enxofre (SO₂) a 6%, na proporção de 0,66 mL/L, seguido por repouso do mosto por aproximadamente 12 horas. Também foi determinado o pH do mosto através de um pHmetro de bancada (Mettler Toledo, modelo FiveEasy) e feita a correção com carbonato de cálcio (se pH abaixo da faixa ideal) ou ácido tartárico (se pH acima da faixa ideal), até atingir pH 3,8. A levedura foi pesada na proporção de 0,3 g/L, hidratada com o próprio mosto conforme instruções do fabricante, e inoculada.

Posteriormente, o mosto foi pasteurizado a 70°C por 30 minutos e, em seguida, resfriado imediatamente. A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL contendo o mosto previamente preparado, cada frasco equipado com um “airlock” (Figura 9). O airlock tem a função de permitir a troca gasosa entre o interior do frasco e

o ambiente externo, evitando a entrada de contaminantes enquanto libera o excesso de dióxido de carbono produzido durante a fermentação. Os Erlenmeyers foram mantidos em temperatura controlada de 25°C e submetidos a agitação constante de 120 rpm, garantindo homogeneização do meio e boa dispersão dos nutrientes, além de favorecer a aeração indireta da cultura. Todas as fermentações foram realizadas em duplicata.

Quando a fermentação atingiu estabilização dos parâmetros, foi interrompida por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado para análises subsequentes.



Figura 9 - Mostos com “airlock” em processo de fermentação.

As etapas de clarificação e maturação do hidromel não foram realizadas neste estudo, uma vez que o objetivo principal da pesquisa foi avaliar a influência da adição de centeio maltado na cinética fermentativa. Entretanto, destaca-se que essas etapas possuem grande importância na qualidade final da bebida, especialmente em relação à estabilidade, limpidez e desenvolvimento das características sensoriais. Além disso, a incorporação de farinha de centeio maltado pode influenciar atributos sensoriais como aroma, sabor, corpo, textura e aparência do hidromel, podendo afetar a aceitação do consumidor. Dessa forma, a realização das etapas de clarificação e maturação, associada a análises sensoriais, representa uma perspectiva relevante para trabalhos futuros, permitindo uma avaliação mais abrangente da qualidade e da aceitação do hidromel produzido.

2.7 Monitorização da Cinética Fermentativa

O acompanhamento rigoroso da cinética fermentativa, desde o mosto inicial até a estabilização do hidromel, é um pilar fundamental para assegurar a reprodutibilidade e a excelência sensorial do produto final. Esta monitorização permite não apenas o controle da eficiência biotecnológica das leveduras, mas também a detecção precoce de desvios metabólicos ou contaminações microbiológicas que possam comprometer a segurança e a qualidade da bebida.

A matriz analisada, bem como os parâmetros e a periodicidade das análises, encontra-se sintetizados na Tabela 3. Os protocolos analíticos detalhados são apresentados nas seções subsequentes. De forma a garantir o rigor estatístico e a confiabilidade dos dados obtidos, todas as determinações foram realizadas, no mínimo, em duplicata, com a inclusão de réplicas adicionais sempre que a variabilidade experimental assim o exigiu.

Tabela 3 - Parâmetros de análise, matriz, periodicidade e referências.

Parâmetros	Matriz analisada	Periodicidade da análise	Referências
Biomassa celular	Mosto e hidromel	Diariamente	[94]
pH	Mosto	Início da fermentação	[95]
Sólidos solúveis (°Brix)	Mosto e hidromel	Diariamente	[95]
Açúcares redutores	Mosto e hidromel	Diariamente	[96]
Acidez total	Mosto e hidromel	Início e fim da fermentação	[95]
Acidez volátil	Hidromel	Fim da fermentação	[95]
Nitrogênio Assimilável (YAN)	Mosto e hidromel	Início e fim da fermentação	[93]
Produtos da fermentação	Hidromel	Início, meio e fim da fermentação	[77]
Dióxido de enxofre (SO ₂)	Hidromel	Fim da fermentação	[97,98]
Eficiência fermentativa	Hidromel	Fim da fermentação	[73]

Efeitos sinérgicos/antagônicos	Hidromel	Fim da fermentação	[99]
-----------------------------------	----------	--------------------	------

2.7.1 Biomassa celular

A avaliação da biomassa celular foi através da quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs). Amostras colhidas diariamente foram submetidas a diluições seriadas e inoculadas em meio *YPD Agar* (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar), com incubação a 25°C por 48 horas. Para assegurar a validade estatística dos resultados, foram consideradas apenas as placas que apresentem entre 15 e 150 colónias. O cálculo da concentração microbiana, expressa em UFC/mL, foi efetuado através da fórmula de média ponderada, representada na Equação (13).

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times (n_1 + (0,1 \times n_2)) \times d} \quad (13)$$

Onde:

ΣC - representa a somatória das colónias contadas em todas as placas retidas de duas diluições consecutivas;

V- é o volume do inóculo aplicado em cada placa (0,1 mL);

n_1 - é o número de placas contadas na primeira diluição selecionada;

n_2 - é o número de placas contadas na segunda diluição selecionada;

d- corresponde ao fator da primeira diluição considerada no cálculo.

2.7.2 Nitrogênio Assimilável

A determinação do nitrogênio assimilável pelas leveduras no mosto e no hidromel foi efetuada através do método do formaldeído [93]. O protocolo iniciou-se com a preparação de uma mistura contendo 10 mL da amostra clarificada por centrifugação e 15 mL de água desionizada, cujo pH foi ajustado para 8,1 com auxílio de uma solução de NaOH (0,1 M).

Sequencialmente, adicionaram-se 2,5 mL de formaldeído (previamente neutralizado para pH 8,1), permitindo-se um período de repouso de cinco minutos para a

estabilização da reação. A etapa final consistiu na titulação da amostra com NaOH (0,05 N) até que o valor de pH retornasse ao ponto de neutralidade inicial (8,1). A partir do volume de titulante consumido nesta última fase, procedeu-se ao cálculo da concentração de nitrogênio absorvível presente nas amostras seguindo a Equação (14).

$$\text{Nitrogênio assimilável} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{volume de NaOH utilizado } 0,05\text{N (mL)} \times 70 \quad (14)$$

2.7.3 Açúcares redutores

A quantificação dos açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), fundamentado na redução deste reagente a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico em meio alcalino e sob aquecimento (Figura 10) [96]. Este processo oxidativo resulta em uma alteração cromática do amarelo para tons de alaranjado ou avermelhado, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de açúcares na amostra.

Para a análise, preparou-se inicialmente uma diluição da amostra em água desionizada (proporção 1:10), seguida de outras diluições subseqüentes de acordo com testes preliminares para a correta leitura e enquadramento na curva padrão. Com o intuito de eliminar interferentes particulados provenientes do centeio maltado, as amostras foram submetidas a processos sequenciais de centrifugação e filtração, garantindo a obtenção de um extrato límpido para a reação.

O procedimento colorimétrico consistiu na homogeneização de volumes iguais (0,5 mL) da amostra diluída e do reagente DNS, submetendo a mistura a banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento e adição de 5 mL de água desionizada, as leituras de absorbância foram conduzidas em espectrofotômetro a 540 nm.

A concentração de AR foi determinada por meio de uma curva de calibração obtida por regressão linear de solução padrão de glicose (0,2 - 1 g/L), utilizando-se água desionizada como "branco" para compensar possíveis interferentes. O cálculo final incorporou os fatores de diluição aplicados durante o preparo das amostras.

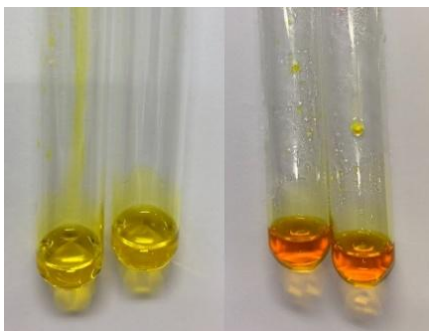


Figura 10 - Diferenciação cromática das amostras antes (esquerda) e após (direita) o aquecimento a 100°C pelo método DNS.

2.7.4 Produtos da fermentação

A determinação de sacarose+maltose, glicose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas na seção 2.2.1, com adaptações para a quantificação dos produtos da fermentação.

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos picos cromatográficos com curvas analíticas obtidas a partir de padrões de glicose (0,4 - 10,02 g/L), frutose (0,4 - 8,11 g/L) e sacarose+maltose (0,20 - 10,07 g/L). Devido às características da coluna cromatográfica utilizada, a sacarose e a maltose apresentaram tempos de retenção muito semelhantes, não sendo possível sua separação nas condições analíticas empregadas. Dessa forma, esses açúcares foram quantificados conjuntamente e os resultados foram expressos como sacarose+maltose.

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico obtido a partir da injeção da mistura de padrões utilizada para a identificação dos compostos analisados, bem como os tempos de retenção aproximados observados para cada analito.

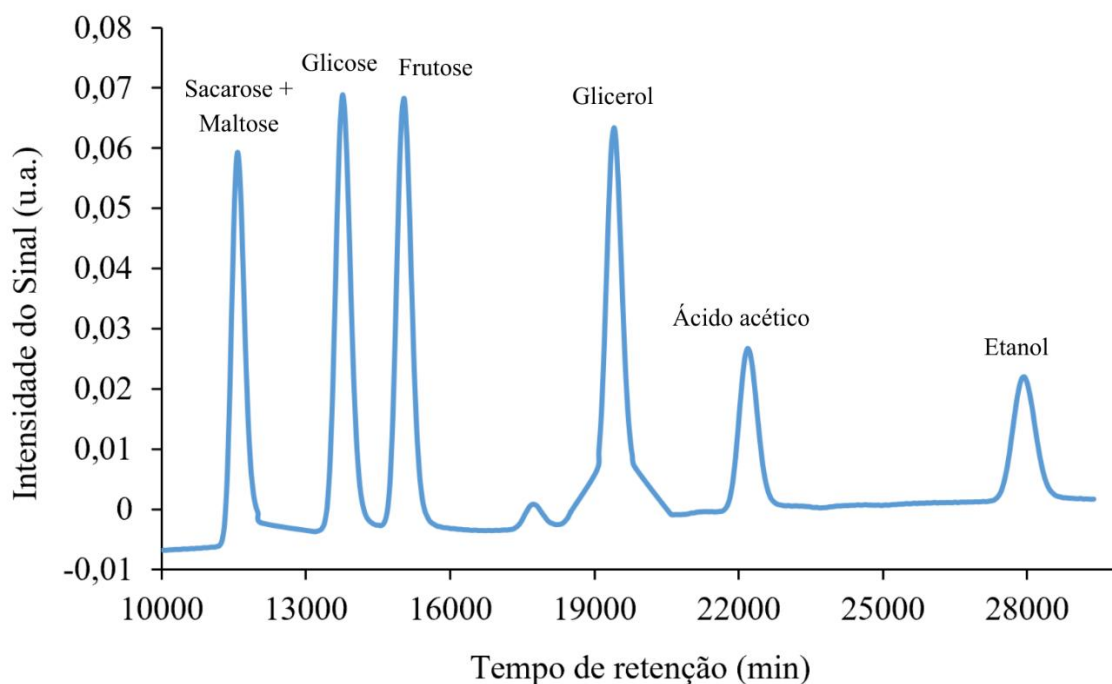


Figura 11 - Perfil cromatográfico da injeção da mistura de padrões.

2.7.5 pH

A determinação do pH das amostras de mosto foi realizada via potenciometria, utilizando-se um pHmetro digital devidamente calibrado com soluções tampão de referência (pH 4,00 e 7,00). As medições ocorreram sob temperatura de 25°C, em conformidade com as diretrizes da International Organisation of Vine and Wine [95]. A leitura foi efetuada após a estabilização do sinal eletroquímico, registrando-se os valores com precisão de duas casas decimais. Entre as análises consecutivas, o eletrodo foi submetido a lavagem com água desionizada para evitar contaminações cruzadas.

2.7.6 Sólidos solúveis

O teor de °Brix do mosto e do hidromel foi medida com o auxílio de um refratômetro portátil (VWR International), de acordo com o método recomendado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho [95].

2.7.7 Acidez total

A acidez total foi determinada de acordo com o método da Organização Internacional da Vinha e do Vinho [95], calculada com base na Equação (15) e expressa em equivalentes de ácido tartárico (g/L). Inicialmente, aproximadamente 50 mL da amostra foram submetidos a degaseificação sob vácuo durante 1–2 minutos, com agitação contínua, a fim de remover dióxido de carbono dissolvido.

Após o preparo, uma alíquota de 10mL da amostra foi titulada com solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M), sob agitação constante, até atingir o ponto final correspondente a pH 7,0, monitorado por pHmetro calibrado.

$$\text{Acidez total (ácido tartárico)} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \text{volume de NaOH gasto (mL)} \times 0,75 \quad (15)$$

2.7.8 Acidez volátil

A aferição da acidez volátil no hidromel seguiu as diretrizes da Organização Internacional da Vinha e do Vinho [95], o resultado foi calculado segundo a Equação (16) e expresso em ácido acético por litro (g/L). O procedimento consistiu na extração dos ácidos por arraste de vapor em um aparelho de Cazenave-Ferré (Anadil). Para isso, 10 mL da amostra foram introduzidos no borbulhador, enquanto 300 mL de água desionizada foram vertidos no matraz. Após a obtenção de 100 mL de destilado, procedeu-se à titulação com NaOH (0,1 M), utilizando fenolftaleína como indicador até a viragem para a coloração rósea.

$$\text{Acidez volátil (ácido acético)} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \text{volume de NaOH gasto (mL)} \times 0,6 \quad (16)$$

2.7.9 Dióxido de enxofre

A quantificação do dióxido de enxofre (SO₂) total no hidromel foi realizada através do método de Ripper. Esta técnica baseia-se numa titulação iodométrica direta em meio ácido, tal como descrito por Curvelo-Garcia [98]. O procedimento iniciou-se com a mistura de 25 mL de amostra e 10 mL de uma solução de NaOH (1 M) num almofariz, procedendo-se à agitação e a um repouso de cinco minutos para garantir a estabilização da amostra.

Posteriormente, incorporaram-se 2,5 mL de uma solução de amido a 1% e 5 mL de ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4 a 1/3), seguindo-se a titulação com uma solução de iodo (0,02 N). O ponto final da reação foi identificado pela mudança cromática de laranja-claro para roxo-escuro. O valor final de SO_2 total foi determinado através da aplicação da Equação (17).

$$\text{SO}_2\text{total} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{volume da solução de iodo gasto (mL)} \times 25,6 \quad (17)$$

2.7.10 Eficiência fermentativa

A Equação (18) foi utilizada para calcular a eficiência fermentativa da fermentação em etanol [100].

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol produzido} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{\left(\text{Açúcar inicial} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) - \text{Açúcar final} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \right)} \times 100 \quad (18)$$

2.7.11 Avaliação de efeitos sinérgicos/antagônicos nos hidroméis

Com o objetivo de avaliar a contribuição intrínseca do centeio maltado, foi realizado um ensaio de fermentação independente, na ausência de mel. Para tal, foram utilizadas soluções de açúcares simples (glicose e frutose) em concentrações equivalentes às quantificadas nas formulações com mel, de acordo com o delineamento experimental estabelecido.

A substituição do mel por uma solução de açúcares permitiu isolar o efeito do centeio maltado, eliminando a interferência de outros constituintes do mel, tais como ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Dessa forma, foi possível avaliar, em condições controladas de fermentação, o potencial do centeio maltado como fonte de compostos bioativos e a sua contribuição para os parâmetros analisados, nomeadamente compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

Os resultados obtidos neste ensaio foram posteriormente utilizados para estimar a contribuição teórica do centeio maltado nas formulações completas do hidromel, sendo integrados no cálculo dos valores esperados para a análise de interações entre os componentes do sistema.

A avaliação das interações entre os componentes foi baseada na comparação entre o efeito observado e o efeito esperado segundo um modelo aditivo, apresentada na Equação (19), abordagem amplamente utilizada em estudos de sinergia, aditividade e antagonismo em sistemas biológicos e alimentares, conforme descrito por Yuan *et al.* [99].

$$SI = \frac{E_{\text{observado}}}{E_{\text{esperado}}} \quad (19)$$

Onde:

- $E_{\text{observado}}$ corresponde ao valor experimental obtido no ensaio contendo centeio maltado e o mel em conjunto.
- E_{esperado} corresponde ao valor teórico calculado com base na soma das contribuições individuais dos ensaios com centeio maltado e mel.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme os seguintes critérios:

- $SI > 1$: efeito sinérgico
- $SI \approx 1$: efeito aditivo
- $SI < 1$: efeito antagónico

A análise foi aplicada aos parâmetros de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, determinada pelo método FRAP.

2.8 Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R [101], utilizando o pacote car para a avaliação da homogeneidade de variâncias [102]. Em todas as análises, adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para a comparação entre o centeio maltado e não maltado, cada parâmetro foi analisado separadamente. Como os dados apresentaram distribuição normal, aplicaram-se testes paramétricos para comparação de duas médias independentes. Quando atendido

o pressuposto de homogeneidade de variâncias, utilizou-se o teste *t de Student*. Quando observada heterogeneidade de variâncias, utilizou-se o teste *t de Welch*.

Para os hidroméis elaborados com 0%, 1%, 2% e 5% de centeio maltado, os parâmetros avaliados apresentaram distribuição normal, porém não atenderam ao pressuposto de homogeneidade de variâncias. Dessa forma, a comparação entre os tratamentos foi realizada por ANOVA de Welch. Quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste pós-hoc de Games-Howell, implementado do pacote *rstatix* [103].

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização polínica e físico-química do mel

A qualidade final do hidromel é condicionada diretamente pela natureza das suas matérias-primas, uma vez que resulta da fermentação de uma mistura de mel e água. Neste estudo, foi selecionado um mel escuro, cuja escolha se fundamenta não apenas nas suas características sensoriais mais intensas, mas também no seu perfil composicional.

Autores reportam que méis escuros tendem a proporcionar melhor desempenho fermentativo, devido à sua composição nutricional mais rica quando comparados com méis claros [29].

Sendo assim, a amostra de mel utilizada foi submetida a uma rigorosa caracterização físico-química e polínica antes dos ensaios de produção. Esta avaliação teve como base os critérios definidos pela legislação portuguesa vigente [24], compreendendo a análise de parâmetros fundamentais como o pH, a umidade, a acidez livre, a condutividade elétrica e o teor de cinzas totais, além da determinação de açúcares (glicose e frutose). Foram ainda verificados indicadores de frescura e qualidade, nomeadamente o índice diastásico e o teor de hidroximetilfurfural (HMF).

Adicionalmente, procedeu-se ao exame microscópico para identificação e contagem de grãos de pólen, técnica que permite atestar a origem floral do mel e reforçar a rastreabilidade da matéria-prima. Os dados detalhados relativos às espécies polínicas encontradas e à sua respetiva frequência encontram-se sistematizados na Tabela 4, permitindo uma caracterização abrangente do mel escuro utilizado como substrato fermentativo neste estudo.

Tabela 4 - Caracterização polínica da amostra de mel.

	% Pólen ± DP
<i>Castanea sativa</i>	50,8 ± 1,70
<i>Prunus</i> spp.	8,75 ± 0,35
<i>Echium</i> spp.	7,45 ± 0,78
<i>Acacia</i> spp.	6,55 ± 0,78
<i>Rubus</i> spp.	8,1 ± 0,71
<i>Cistus</i> spp.	2,25 ± 0,35
<i>Trifolium</i> spp.	2,4 ± 0,57

<i>Olea europaea</i>	5,25 ± 0,35
<i>Cistus ladanifer</i>	4,25 ± 0,35
<i>Erica</i> spp.	4,2 ± 0,42

A análise revelou um perfil polínico diversificado, indicando que o mel apresenta origem multifloral, com predominância de *Castanea sativa* (~51%). De acordo com os critérios clássicos de classificação, como os propostos por Louveaux *et al.* [79], esta percentagem situa-se no limiar dos pólenes dominantes, sugerindo uma forte contribuição do castanheiro. Segundo a literatura, esse fato pode estar associado a características sensoriais mais intensas e a um maior teor de compostos bioativos [29].

No entanto, a presença de outros tipos polínicos em proporções relevantes, como *Prunus* spp. (8,75%), *Echium* spp. (7,45%), *Acacia* spp. (6,55%) e *Rubus* spp. (8,1%), reforçam a classificação do mel como multifloral.

Os restantes pólenes identificados, nomeadamente *Cistus* spp., *Trifolium* spp., *Olea europaea*, *Cistus ladanifer* e *Erica* spp., surgem em menores quantidades, sendo classificados como pólenes minoritários.

Em relação à caracterização físico-química do mel, os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos analisados no mel.

Parâmetros analisados	Médias ± Desvio padrão
HMF (mg/kg)	1,50 ± 0,02
Índice diastásico (escala de Schade)	31,54 ± 2,98
Acidez total (meq/kg)	45,76 ± 0,45
pH	4,80 ± 0,02
Umidade (%)	16,23 ± 0,11
Cinzas (%)	0,083 ± 0,001
Condutividade elétrica (mS/cm)	1,09 ± 0,01
Açúcares redutores (g/100g)	52,75 ± 0,17

Os parâmetros mais indicativos da frescura do mel e da ausência de sobreaquecimento são o hidroximetilfurfural (HMF) e o índice diastásico. O teor de HMF

obtido foi de 1,5 mg/kg. Este valor encontra-se muito abaixo do limite máximo permitido pela lei (40 mg/kg), indicando elevada frescura e ausência de degradação térmica significativa. Corroborando este dado, o índice diastásico apresentou um valor de 31,55 (escala de Schade), cumprindo o valor mínimo legal de 8 [24].

A amostra apresentou uma acidez total de 45,76 meq/kg, embora este valor esteja próximo do limite máximo estabelecido pela legislação (50 meq/kg), encontra-se dentro da conformidade. Este nível de acidez, conjugado com o pH de 4,80, sugere um mel com características ácidas naturais, contribuindo para a sua estabilidade microbiológica ao inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis antes do início da fermentação alcoólica [2].

O teor de umidade do mel analisado foi de aproximadamente 16,23%, valor inferior ao limite máximo de 20% estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 214/2003 [24]. Este resultado indica uma boa estabilidade do produto, uma vez que baixos teores de umidade reduzem o risco de fermentação por leveduras osmofílicas, favorecendo para a sua conservação durante o armazenamento [2].

Relativamente ao teor de cinzas, o valor obtido, $0,083 \pm 0,001\%$, encontra-se dentro dos intervalos normalmente reportados para méis, refletindo um conteúdo mineral reduzido a moderado. De acordo com a literatura, o teor de cinzas é um importante indicador da fração mineral do mel e está diretamente associado à sua origem botânica [104]. Importa ainda salientar que, ao contrário de outros parâmetros, o Decreto-Lei n.º 214/2003 não estabelece limites legais específicos para o teor de cinzas.

No que respeita à condutividade elétrica, o valor obtido, $1,09 \pm 0,01$ mS/cm, enquadra-se nas exceções previstas pelo Decreto-Lei n.º 214/2003, que admite valores superiores a 0,8 mS/cm para méis de melada, méis de flores de castanheiro (*Castanea sativa*) e respetivas misturas. A análise polínica evidenciou uma predominância de *Castanea sativa* (45%), espécie associada a valores naturalmente elevados de condutividade elétrica. Assim, o resultado observado é compatível com a origem botânica do mel, não configurando uma não conformidade, mas sim uma característica intrínseca do produto.

No que diz respeito aos açúcares redutores, particularmente glicose e frutose, o valor obtido, $52,75 \pm 0,17$ g/100 g, encontra-se abaixo do mínimo de 60 g/100 g estabelecido para méis de néctar. No entanto, o Decreto-Lei n.º 214/2003 prevê um limite mínimo de 45 g/100g para méis de melada ou misturas de mel de néctar e melada.

Considerando a diversidade polínica observada, é plausível que o mel analisado apresente características de um mel multifloral com possível influência de melada.

De forma global, a integração dos parâmetros físico-químicos com a análise polínica evidencia que o mel analisado apresenta características compatíveis com um produto de origem multifloral com forte influência de *Castanea sativa* e possível contribuição de melada. Esta abordagem integrada permite justificar os desvios face aos critérios gerais da legislação, reforçando a importância da análise polínica na correta classificação e avaliação da qualidade do mel.

3.2 Centeio ibérico

3.2.1 Eficiência da malteação

A malteação foi conduzida segundo o protocolo descrito por Calvi *et al.* [16]. Durante a maceração observou-se o aparecimento de radículas em vários grãos (Figura 12), indicando ativação metabólica e início da germinação. O surgimento da radícula constitui um indicador visual importante da eficácia do processo [105].



Figura 12 - Início do surgimento da radícula em grão de centeio ibérico durante a etapa de maceração.

A umidade dos grãos foi monitorada por pesagens sucessivas durante a maceração, observando-se um aumento progressivo até atingir valores próximos a 40%, nível considerado mínimo para ativação fisiológica da germinação. Embora a literatura

recomende valores ideais entre 44% e 48% para modificação mais completa dos grãos [16], o surgimento da radícula já demonstra que a umidade alcançada foi suficiente para a ativação metabólica do embrião [105]. Visualmente, o surgimento de radículas foi mais evidente ao final do segundo ciclo de maceração, confirmando que o protocolo adotado favoreceu o início da germinação com sucesso.

3.2.2 Caracterização físico-química do centeio ibérico

A Tabela 6 apresenta as médias dos parâmetros analisados para as farinhas maltada e não maltada.

Tabela 6 - Resultados da caracterização físico-química do centeio em estudo.

Análises	Não maltado	Maltado
Proteínas (%)	8,75 ± 0,55 ^a	9,02 ± 0,46 ^a
Lipídios (%)	2,49 ± 0,07 ^a	3,35 ± 0,40 ^b
Umidade (%)	9,96 ± 0,45 ^a	6,63 ± 1,11 ^b
Cinzas (%)	1,50 ± 0,08 ^a	1,36 ± 0,04 ^a
Carboidratos (%)	77,28 ± 0,84 ^a	79,63 ± 1,25 ^b
Sacarose + Maltose (g/100g)	1,09 ± 0,03 ^a	3,51 ± 0,02 ^b
Glicose (g/100g)	0,069 ± 0,002 ^a	0,63 ± 0,02 ^b
Frutose (g/100g)	0,064 ± 0,002 ^a	0,127 ± 0,002 ^b

Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

O teor de proteínas não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as amostras ($p > 0,05$), embora tenha sido ligeiramente maior no centeio maltado (9,02%) em comparação ao não maltado (8,76%). Esse resultado é consistente com a literatura, que aponta alterações qualitativas e aumento na digestibilidade das proteínas durante a germinação, mesmo que o teor absoluto de proteína permaneça estável, proporcionando maior biodigestibilidade dos nutrientes em caso de fermentação [45,48,49].

Os teores de lipídios aumentaram significativamente no centeio maltado (3,36%) quando comparados ao não maltado (2,49%). Segundo Al-Taher e Nemzer [13], esse aumento pode decorrer da biossíntese de novos lipídios durante a germinação ou de modificações estruturais que favorecem sua extração. No entanto, outros autores relatam reduções de lipídios em grãos germinados, atribuídas à atividade lipolítica [43]. Essa divergência pode estar associada à espécie, tempo e condições da germinação.

Do ponto de vista fermentativo, o aumento lipídico pode exercer um efeito benéfico indireto, uma vez que os lipídios, particularmente ácidos graxos insaturados e esteróis, desempenham papel essencial na manutenção da integridade e fluidez da membrana celular das leveduras. Essa função é especialmente relevante em condições de stress, como elevada pressão osmótica e aumento da concentração de etanol, contribuindo para maior tolerância celular e redução do risco de paragens fermentativas [106,107].

Quanto à umidade, observou-se decréscimo significativo no centeio maltado (6,63%) em comparação ao não maltado (9,96%), fato atribuído ao processo final de secagem, necessário para interromper a germinação [50]. Já os teores de cinzas não diferiram significativamente ($p > 0,05$), mantendo aproximadamente 2% de cinzas, sugerindo preservação global da fração mineral do grão [45,51].

No que concerne à fração de carboidratos totais, o aumento estatisticamente significativo de 77,28% no centeio não maltado para 79,63% no maltado representa um efeito matemático de concentração e não a biossíntese de nova massa glicídica. Como esta fração foi calculada por diferença em base úmida, a redução drástica da umidade decorrente da secagem do malte encolheu a porção de água na amostra, forçando o aumento relativo do valor residual para completar a totalidade da composição centesimal. Do ponto de vista fisiológico, a quantidade absoluta de carboidratos permanece estável ou sofre leve declínio devido ao consumo energético da respiração celular. A principal alteração impulsionada pela germinação ocorre no perfil estrutural desta matriz, na qual a expressiva atividade das enzimas amilolíticas fragmenta o amido de reserva e o converte em moléculas menores [53].

Quanto a alterações possíveis que a malteação pode promover verificou-se um aumento significativo na fração de açúcares simples, refletindo o elevado poder diastásico desenvolvido na germinação do grão.

Os valores quantificados no centeio maltado para a glicose (0,63 g/100g) e frutose (0,12 g/100g) encontram-se em forte concordância com a literatura recente. Murniece *et*

al. e Pejcz *et al.* [53,108] relataram teores variando entre 0,50 e 0,75 g/100g para a glicose e entre 0,08 e 0,48 g/100g para a frutose em diferentes amostras de malte de centeio.

Adicionalmente, embora o presente estudo tenha quantificado a sacarose e a maltose em conjunto (atingindo 3,51 g/100g no centeio maltado), este resultado corrobora os dados da literatura quando analisados de forma combinada. No estudo supramencionado, a sacarose variou de 2,31 a 3,18 g/100g e a maltose de 0,82 a 1,29 g/100g [53,108]. A soma destas frações resulta num intervalo teórico de 3,13 a 4,47 g/100g, confirmando que a nossa matriz se enquadra perfeitamente no perfil esperado para um malte com boa atividade enzimática.

No contexto da produção de hidromel, o fornecimento imediato de glicose e frutose funciona como um gatilho energético durante a fase de latência da *Saccharomyces cerevisiae* QA23™. Esses açúcares de rápida assimilação favorecem o início da atividade fermentativa, promovendo maior eficiência na adaptação celular ao meio e contribuindo para uma cinética fermentativa mais robusta e estável [5].

3.2.3 Compostos bioativos e capacidade antioxidante no centeio

Em relação aos compostos bioativos e capacidade antioxidante no centeio, os resultados obtidos demonstraram que a malteação promoveu alterações significativas. Os valores quantitativos e os respectivos desvios padrão encontram-se detalhados na Tabela 7, enquanto a magnitude proporcional desse incremento pode ser visualizada graficamente na Figura 13.

Tabela 7 – Teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante das farinhas de centeio não maltado e maltado.

Parâmetro Analisado	Não maltado	Maltado	Aumento Relativo
Fenólicos Totais (mg EAG/g)	3,75 ± 0,13 ^a	21,31 ± 0,35 ^b	5,68x
DPPH (mg ETrolox/g)	0,42 ± 0,01 ^a	1,43 ± 0,08 ^b	3,40x
FRAP (mg EFeII/g)	1,08 ± 0,05 ^a	3,94 ± 0,11 ^b	3,65x

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

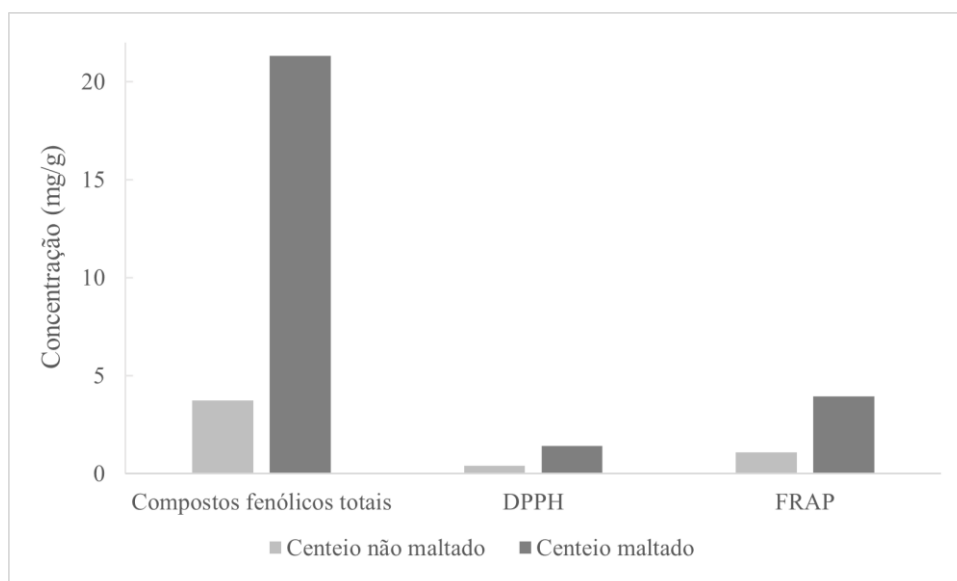


Figura 13 – Efeito dos compostos bioativos do centeio maltado e não maltado.

Conforme expresso na Tabela 7, o centeio não maltado apresentou valores de compostos fenólicos totais de $3,75 \pm 0,13$ mg EAG/g, enquanto o centeio maltado apresentou valores substancialmente superiores, $21,31 \pm 0,35$ mg EAG/g, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A Figura 12 ilustra de forma clara esta variação quantitativa, evidenciando um aumento expressivo de aproximadamente 6 vezes após o processo de malteação. Esse comportamento está de acordo com o descrito na literatura, que aponta a malteação como um processo capaz de aumentar a disponibilidade de compostos fenólicos em cereais. De acordo com o estudo de Mancino *et al.* [109], a malteação promove alterações metabólicas significativas em farinhas de centeio, resultando em maior abundância relativa de compostos fenólicos quando comparado ao grão não germinado.

A literatura descreve que os compostos fenólicos no centeio estão majoritariamente presentes na forma ligada à parede celular, especialmente associados a arabinoxilanos e lignina [64]. Esses compostos estão concentrados principalmente nas frações externas do grão e sua extração depende da ruptura da matriz estrutural. Durante a germinação, ocorre ativação de enzimas como esterases e outras hidrolases, que promovem a liberação desses compostos previamente ligados, aumentando sua fração solúvel [110].

A capacidade antioxidante apresentou a mesma tendência de aumento observada para os compostos fenólicos totais, embora em menor magnitude, como visualmente corroborado pelas barras na Figura 13. Analisando os dados da Tabela 7, observa-se que

os valores obtidos pelo método DPPH aumentaram de aproximadamente $0,42 \pm 0,01$ mg ETrolox/g no centeio não maltado para $1,43 \pm 0,08$ mg ETrolox/g no centeio maltado, enquanto os valores de FRAP aumentaram de $1,08 \pm 0,05$ mg EFe²⁺/g para $3,94 \pm 0,11$ mg EFe²⁺/g, sendo também diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Esse comportamento está de acordo com a literatura, que demonstra forte relação entre compostos fenólicos e capacidade antioxidante. O estudo de Andreasen *et al.* [111] demonstrou que extratos fenólicos de centeio apresentam elevada capacidade antioxidante, especialmente devido à presença do ácido ferúlico.

Mas, conforme já citado, o aumento da capacidade antioxidante não teve a mesma magnitude do aumento dos compostos fenólicos totais. Enquanto os compostos fenólicos apresentaram aumento de aproximadamente seis vezes, os valores de DPPH e FRAP aumentaram cerca de três a quatro vezes. Esse comportamento sugere que nem todos os compostos quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu contribuíram efetivamente para a capacidade antioxidante. Essa limitação do método é amplamente reconhecida, uma vez que o reagente de Folin-Ciocalteu pode reagir com outros compostos redutores presentes na amostra [112–114]. Durante a malteação, ocorrem transformações metabólicas que podem levar à formação de compostos adicionais com capacidade redutora, como açúcares e pequenos peptídeos, os quais podem contribuir para a superestimação dos valores obtidos [115].

Além disso, diferenças nos valores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante reportados na literatura podem ser atribuídas a diversos fatores, incluindo condições da malteação (tempo, temperatura e umidade), diferenças entre cultivares de centeio, bem como ao tipo de solvente e método de extração utilizados [56]. Dessa forma, embora os valores absolutos possam variar entre diferentes estudos, a tendência de aumento dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante após a malteação é consistente.

O aumento da capacidade antioxidante poderá ser particularmente relevante na produção de hidromel, uma vez que compostos antioxidantes contribuem para maior estabilidade oxidativa e podem influenciar positivamente o perfil sensorial da bebida final [74,77].

De forma global, os resultados sugerem que a malteação do centeio não apenas melhora a disponibilidade de nutrientes fermentativos, mas também pode aumentar o potencial tecnológico da matéria-prima através do enriquecimento em compostos bioativos.

3.2.4 Nitrogênio assimilável no centeio

Procedeu-se à quantificação do nitrogênio assimilável utilizando a clássica metodologia de titulação pelo formaldeído [93]. A análise avaliou a adição de 50 g/L de centeio (maltado e não maltado) a um mosto padrão de mel e água ajustado para 23°Brix e, após a subtração do valor de nitrogênio fornecido exclusivamente pelo mel, revelou-se diferenças significativas ($p \text{ value} = 6,27 \times 10^{-8}$) entre as amostras. A Figura 14 mostra que o centeio maltado forneceu, em média, $68,83 \pm 0,49 \text{ mgN/L}$ ao mosto, um valor aproximadamente catorze vezes superior à contribuição da amostra de centeio não maltado, que se fixou em apenas $4,67 \pm 0,99 \text{ mgN/L}$.

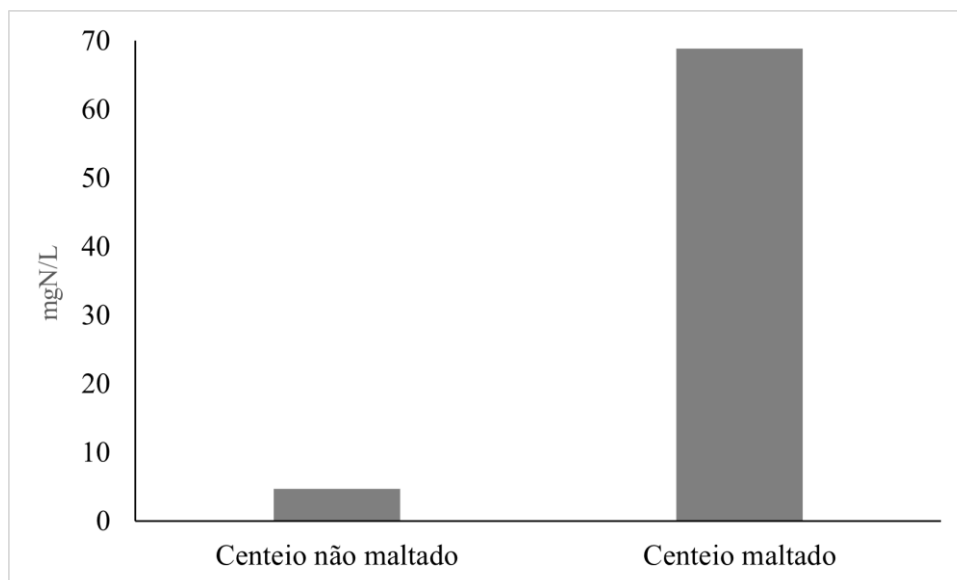


Figura 14 - Contribuição de nitrogênio assimilável, expresso em mgN/L, de 50g/L de centeio não maltado e maltado adicionada a um mosto de mel.

Esta disparidade marcante corrobora a literatura científica sobre o impacto da maceração e germinação de cereais na solubilização de compostos nitrogenados [50,53,60]. A justificação fisiológica para este fenômeno reside no estado físico das matrizes proteicas no endosperma do grão. Apesar do resultado da análise bruta de proteína não ter apresentado diferenças significativas, pode-se notar que no centeio não maltado o nitrogênio encontra-se predominantemente incorporado em proteínas de reserva de alto peso molecular, como as prolaminas e as glutelinas [116].

Nestas macromoléculas, o nitrogênio encontra-se majoritariamente ligado em pontes peptídicas internas, existindo reduzida quantidade de grupos amina livres disponíveis [117,118]. Como a titulação pelo formaldeído detecta especificamente estes grupos, a reduzida degradação proteica no centeio não maltado limita a quantidade de compostos tituláveis presentes no mosto, justificando os baixos valores de YAN observados.

Deste modo, verificou-se que a adição direta de centeio não maltado apresenta reduzida eficácia tecnológica como fonte de nitrogênio assimilável, enquanto o centeio maltado se destaca como suplemento natural promissor para enriquecimento nutricional de mostos fermentativos.

3.3 Caracterização físico-química do mosto e do hidromel

Com base na avaliação físico-química e bioativa, a etapa fermentativa foi conduzida exclusivamente com centeio maltado. Para fins de padronização nos próximos tópicos, o termo 'centeio', quando aplicado à produção de hidromel, designa exclusivamente o grão maltado.

3.3.1 Cinética de crescimento microbiano durante a fermentação

A monitorização da população de leveduras ao longo do tempo permitiu avaliar o impacto da suplementação com centeio na capacidade proliferativa da *Saccharomyces cerevisiae*. A evolução da biomassa viável (expressa em $\ln$ UFC/mL) encontra-se representada na Figura 15, e os respectivos parâmetros cinéticos, calculados a partir da fase exponencial, estão sumarizados na Tabela 8.

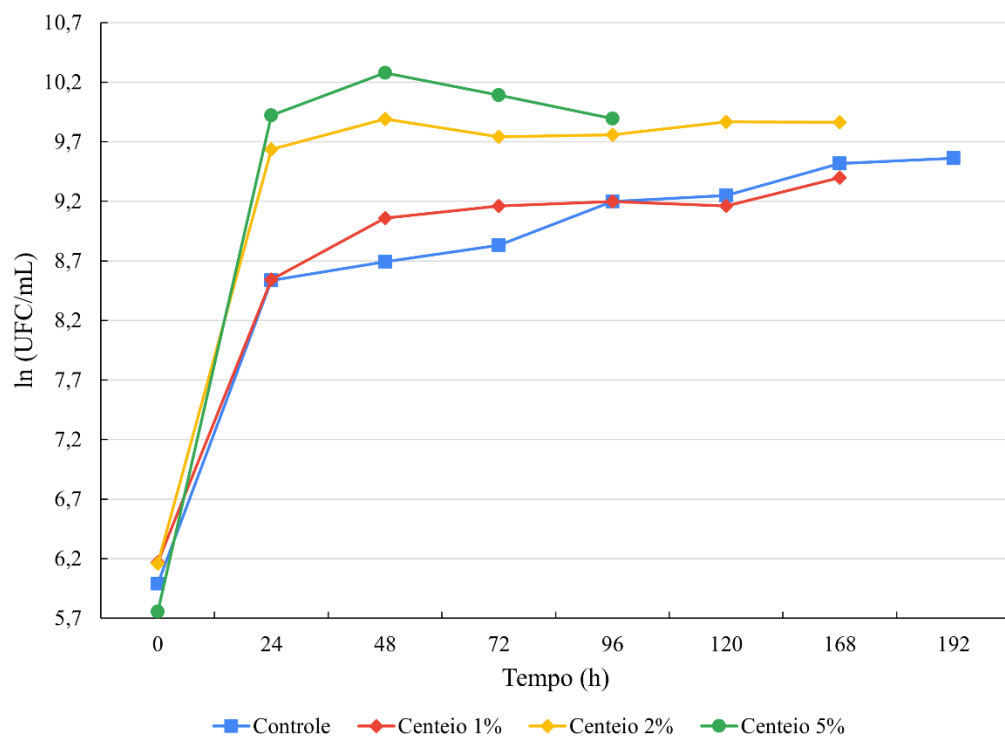


Figura 15 - Cinética de crescimento microbiano durante a fermentação do hidromel.

A Figura 15 evidencia diferenças claras na cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em função da concentração de centeio adicionada ao mosto.

Em todas as formulações, observou-se crescimento microbiano imediatamente após a inoculação, comportamento esperado devido à ativação prévia da cultura seca ativa antes da fermentação. No entanto, as formulações suplementadas com centeio maltado apresentaram comportamento distinto relativamente ao controle.

O tratamento com 5% apresentou o declive mais acentuado da curva durante as primeiras 48 horas, evidenciando maior velocidade de crescimento das leveduras. Este comportamento é corroborado pelos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 8, onde esta formulação apresentou o maior valor de taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}) ($0,174 \text{ h}^{-1}$) e o menor tempo de duplicação celular (3,99 h).

A quantificação matemática destas observações confirma a vantagem cinética da suplementação mais elevada (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*.

Formulação	$\mu_{max}(h^{-1})$	Tempo de duplicação (td) (h)	Tempo de fermentação (h)*
Controle	0,106	6,53	192
Centeio 1%	0,099	7,01	168
Centeio 2%	0,145	4,78	168
Centeio 5%	0,174	3,99	96

*Determinado pela estabilização do valor de °Brix.

Em contraste, o controle e a formulação com 1% apresentaram menor crescimento celular, refletido nos menores valores de μ_{max} (0,106 e 0,099 h⁻¹, respetivamente) e nos maiores tempos de duplicação celular. A formulação com 2% apresentou comportamento intermédio, aproximando-se do perfil observado na formulação com 5%, embora com menor taxa específica de crescimento.

As diferenças observadas sugerem que a suplementação com centeio aumentou a disponibilidade de nutrientes essenciais ao metabolismo fermentativo, nomeadamente nitrogénio assimilável, aminoácidos, minerais e vitaminas. Estes compostos poderão ter favorecido a atividade metabólica das leveduras e promovido maior eficiência no crescimento celular.

O impacto operacional mais relevante observou-se na duração total da fermentação. A aceleração do crescimento na condição de 5% permitiu concluir o processo em apenas 96 horas, o que representa uma redução de 50% comparativamente ao controle (192 horas). As condições de 1% e 2%, embora distintas em termos de μ_{max} , estabilizaram ambas às 168 horas, oferecendo ainda assim uma vantagem temporal sobre o mosto controle.

Globalmente, os resultados demonstram que a suplementação com centeio influenciou positivamente a cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, promovendo maior velocidade de crescimento celular e redução do tempo total de fermentação.

Este fato, sugere que a matriz cerealífera poderá atuar como fonte de vitaminas, minerais, e proteínas, compostos fundamentais para a integridade da membrana plasmática e para a eficiência metabólica celular. Estes fatores poderão justificar as maiores taxas de crescimento observadas e a redução significativa do tempo da fermentação [106,117].

3.3.2 Nitrogênio assimilável no mosto e hidromel

A Figura 16 apresenta a variação do nitrogênio assimilável (YAN) em função da percentagem de centeio adicionada, antes e após o ajuste.

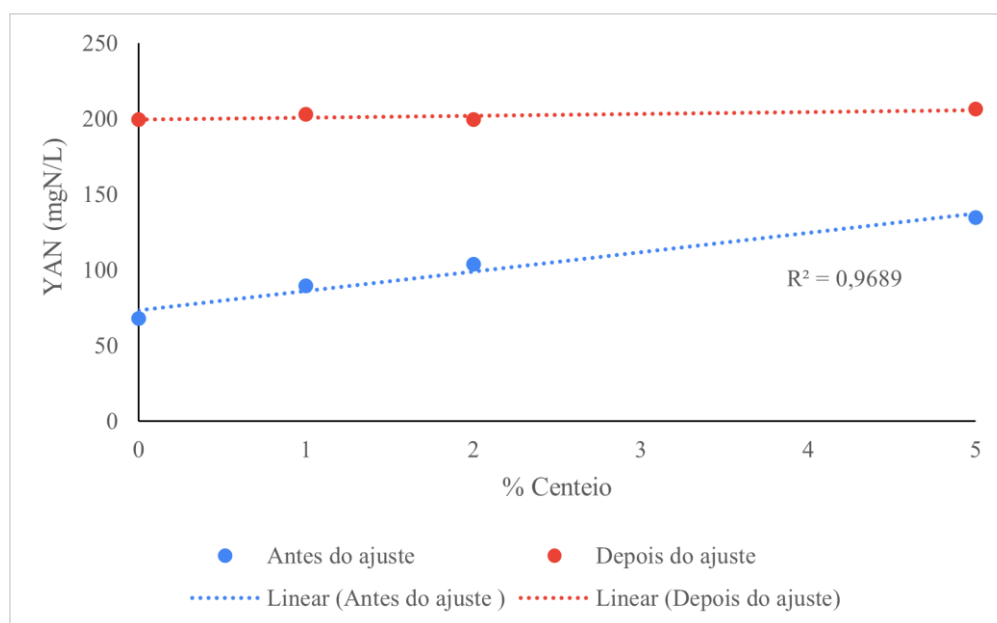


Figura 16 - Evolução do YAN em função da percentagem de centeio antes e depois do ajuste.

Observou-se aumento progressivo do YAN com o incremento da concentração de centeio, evidenciando um bom ajuste do modelo linear aos dados experimentais ($R^2 = 0,974$). Estes resultados confirmam a contribuição do centeio como fonte complementar de nitrogênio assimilável para o meio fermentativo.

Apesar deste aumento, mesmo a formulação com 5% permaneceu abaixo do intervalo crítico de 140 - 150 mgN/L normalmente considerado necessário para assegurar fermentações completas e evitar stress metabólico na *Saccharomyces cerevisiae* [5,73].

A necessidade de suplementação diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de centeio, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros de suplementação e substituição do nutriente comercial Enovit.

Amostra	Centeio (g/L)	YAN Inicial (mgN/L)	Enovit Adicionado (g/L)	Redução de Aditivo (%)
Controle	0	66,50 ± 2,97	0,57	-
Centeio 1%	10	87,50 ± 1,98	0,48	15,8%
Centeio 2%	20	101,50 ± 1,48	0,42	26,3%
Centeio 5%	50	133,00 ± 2,47	0,29	49,9%

A formulação com 5% necessitou apenas de 0,29 g/L de nutriente comercial, correspondendo a uma redução aproximada de 49,9% relativamente ao controle. Este resultado demonstra que a farinha maltada poderá substituir parcialmente suplementos sintéticos, contribuindo para formulações mais naturais e sustentáveis.

A análise de nitrogênio assimilável residual após a fermentação (Figura 17) revelou consumo eficiente por parte de *Saccharomyces cerevisiae* nas formulações controle, 1% e 2%, que apresentaram concentrações residuais semelhantes, entre 35 e 38 mgN/L. Estes resultados indicam assimilação equilibrada do nitrogênio proveniente do Enovit e do centeio.

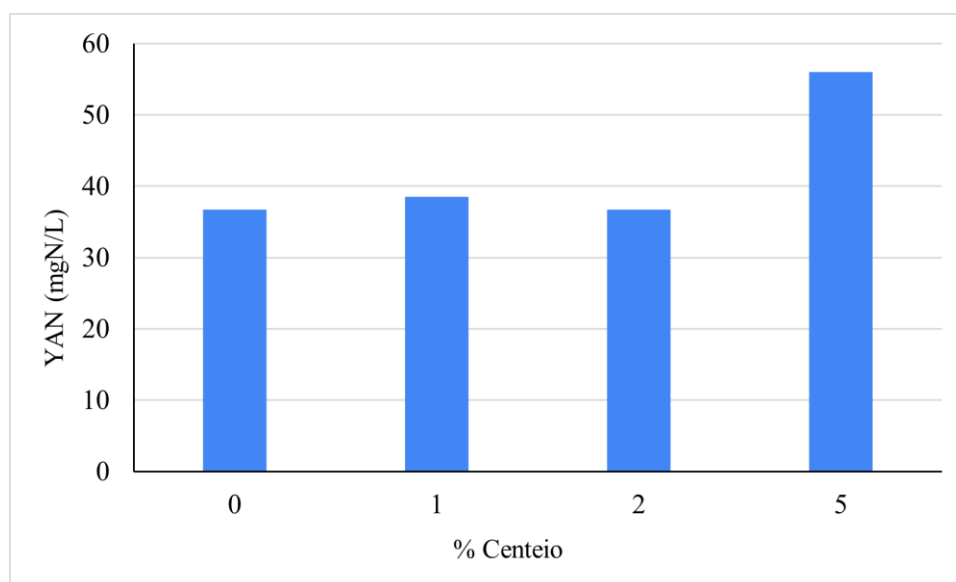


Figura 17 - Teores de nitrogênio assimilável após o término da fermentação.

Em contraste, a formulação com 5% apresentou valor residual significativamente superior (~56 mgN/L), sugerindo a presença de frações nitrogenadas mais complexas, como proteínas de reserva e peptídeos de elevado peso molecular, que não são totalmente

assimilados durante a fermentação. Adicionalmente, deve-se considerar que o método de titulação com formaldeído, utilizado para a determinação do nitrogênio assimilável, pode superestimar a fração residual, uma vez que o formaldeído reage não apenas com aminoácidos livres, mas também com outros compostos nitrogenados contendo grupos amino, não refletindo exclusivamente o nitrogênio efetivamente assimilável pelas leveduras, entre estes destaca-se a prolina, que, embora reaja no método analítico, não é metabolizada por *Saccharomyces cerevisiae* em condições anaeróbias, uma vez que sua assimilação depende da disponibilidade de oxigênio [119].

Do ponto de vista microbiológico, concentrações elevadas de nitrogênio assimilável residual podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes durante o armazenamento [5]. Contudo, a presença residual de aminoácidos e outros compostos nitrogenados poderá também influenciar positivamente o perfil aromático do hidromel, uma vez que estes compostos participam em vias metabólicas associadas à formação de álcoois superiores e ésteres durante a fermentação [40].

De modo geral, os resultados demonstram que o centeio atua como fonte relevante de nitrogênio assimilável, reduzindo significativamente a necessidade de suplementação sintética e contribuindo para a otimização nutricional do mosto fermentativo. Contudo, a interpretação dos valores residuais deve considerar as limitações inerentes ao método analítico utilizado para a determinação do nitrogênio assimilável.

3.3.3 Cinética de consumo de açúcares

A análise da cinética fermentativa demonstrou que a composição do mosto influenciou diretamente a velocidade de assimilação dos açúcares. A Figura 18 apresenta o perfil de consumo de açúcares redutores ao longo da fermentação nas diferentes formulações.

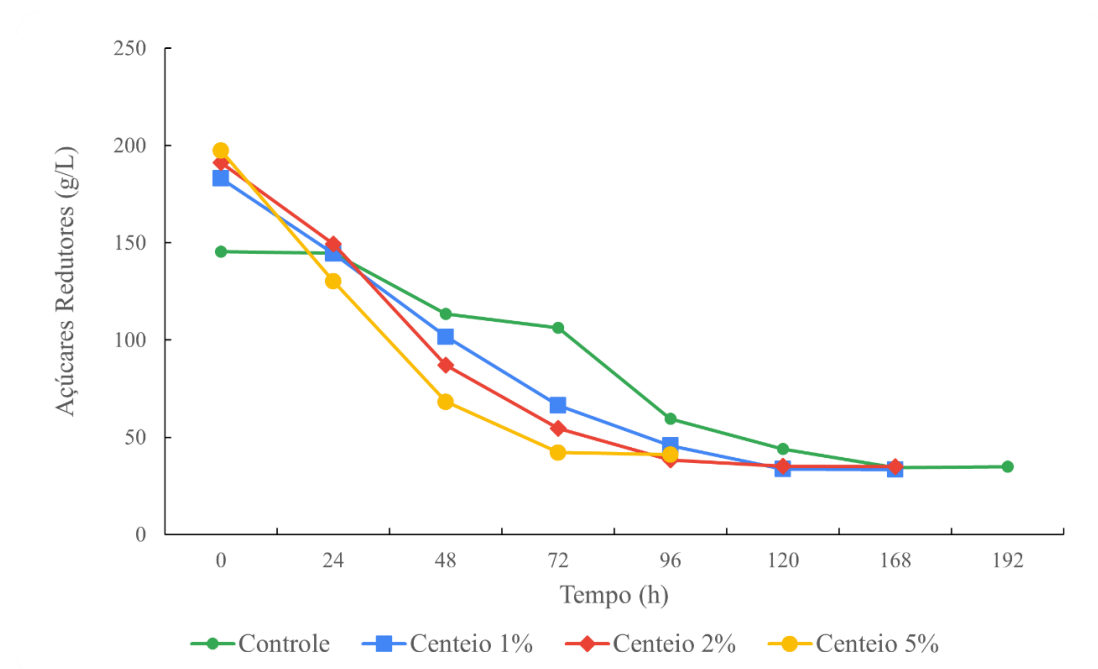


Figura 18 - Perfil cinético de consumo de açúcares redutores totais pelo método de DNS.

O controle apresentou consumo mais gradual, enquanto os tratamentos suplementados com 1%, 2% e 5% de centeio exibiram taxas de consumo significativamente superiores, sobretudo nas primeiras 72 horas. Este comportamento relaciona-se com o aporte nutricional do centeio maltado, caracterizada por maiores concentrações de glicose, frutose e nitrogênio assimilável.

O fornecimento adicional destes nutrientes poderá ter favorecido a síntese de transportadores de hexoses e estimulado a atividade fermentativa da levedura, promovendo fermentações mais rápidas e eficientes [120,121].

A Figura 19 apresenta a evolução dos açúcares individuais e da produção de metabólitos ao longo da fermentação, permitindo avaliar o efeito da suplementação com centeio no metabolismo fermentativo.

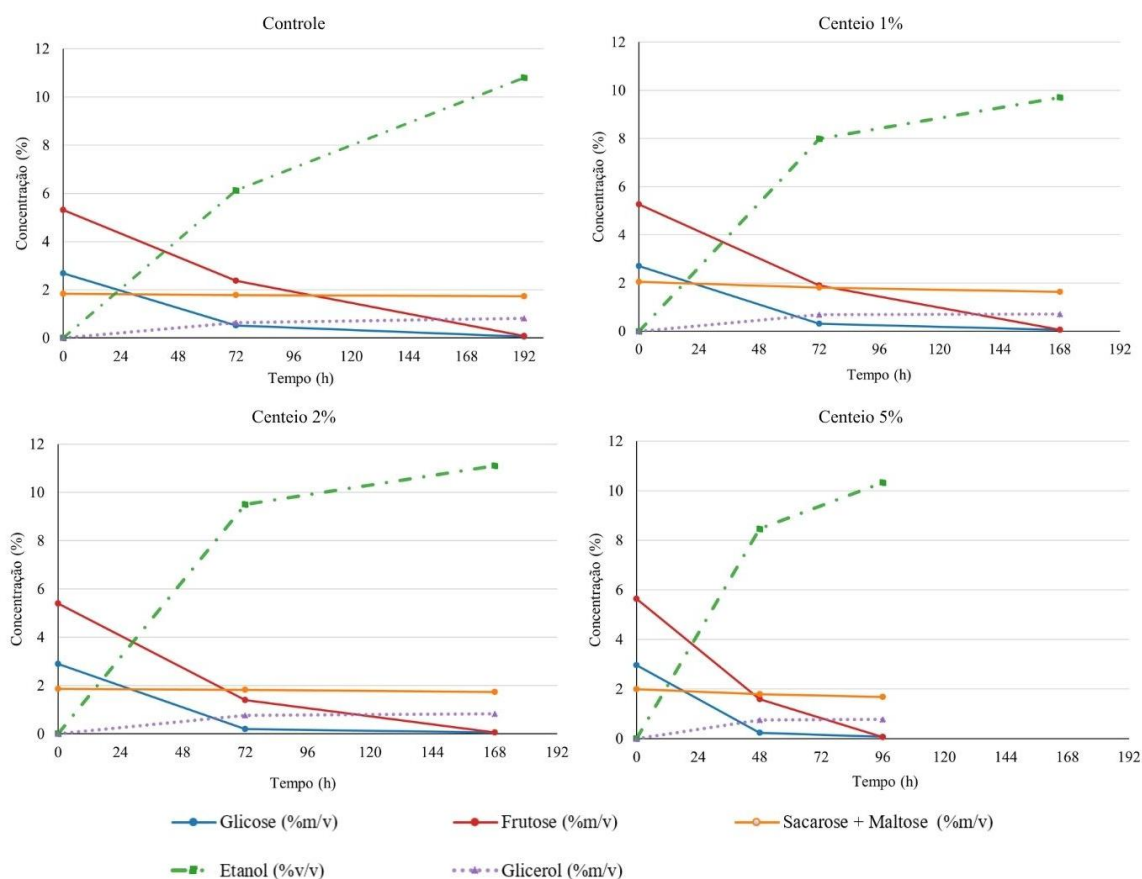


Figura 19 - Cinética de consumo de açúcares individuais e produção de metabólitos quantificados por HPLC.

Em relação à análise da cinética fermentativa por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) revelou-se um padrão típico de consumo preferencial de hexoses pela *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizado pela assimilação inicial da glicose, seguida da frutose, concomitantemente à produção de etanol. Nos tratamentos suplementados com 2% e 5% de centeio, a glicose foi praticamente esgotada entre 48 e 72 horas, comportamento consistente com os resultados obtidos pelo método DNS.

Este fenómeno está associado à repressão catabólica pela glicose, mecanismo regulatório através do qual a presença deste açúcar favorece preferencialmente a sua própria assimilação em detrimento de outros substratos fermentescíveis [32]. Após a redução da glicose disponível, observou-se aumento do consumo de frutose, embora a uma velocidade inferior, consistente com o caráter glucofílico de *Saccharomyces cerevisiae* [122,123].

O perfil cromatográfico final (Figura 20) evidenciou apenas picos residuais de glicose e frutose, contrastando com a predominância de etanol e dissacarídeos não assimilados.

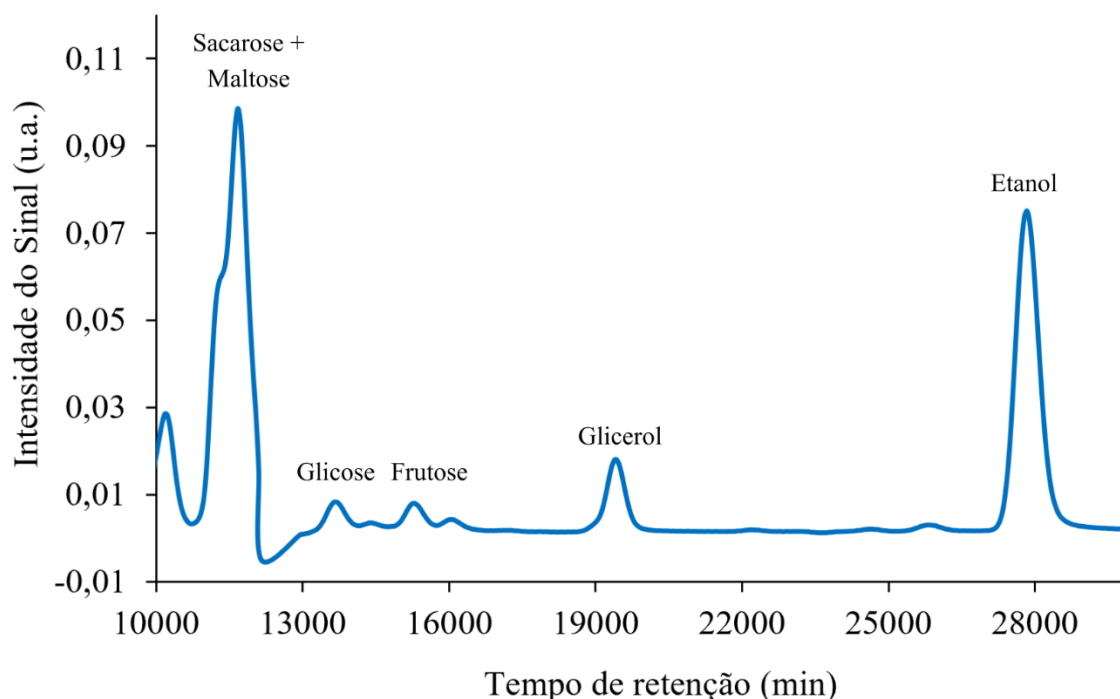


Figura 20 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC da amostra final de hidromel suplementado com 5% de centeio ibérico maltado.

Cabe ressaltar que, por meio da metodologia de HPLC empregada, não foi possível quantificar o ácido acético. Dessa forma, para a determinação deste metabólito e monitoramento da sanidade da fermentação, será utilizada a análise complementar de acidez volátil.

A Tabela 10 apresenta a composição final dos hidroméis, incluindo açúcares residuais, produção de metabólitos e parâmetros físico-químicos, em função da suplementação com centeio.

Tabela 10 - Perfil de açúcares residuais e caracterização final dos hidroméis.

Parâmetros	Controle	Centeio 1%	Centeio 2%	Centeio 5%
Glicose (g/L)	$0,60 \pm 0,03^a$	$0,51 \pm 0,07^a$	$0,58 \pm 0,05^a$	$0,65 \pm 0,03^a$
Frutose (g/L)	$0,84 \pm 0,08^a$	$0,51 \pm 0,07^b$	$0,59 \pm 0,02^b$	$0,58 \pm 0,02^b$

Sacarose + maltose (g/L)	17,48 ± 0,05 ^a	17,70 ± 0,4 ^a	17,60 ± 0,2 ^a	17,83 ± 0,09 ^a
Glicerol (g/L)	7,8 ± 0,3 ^a	7,2 ± 0,5 ^a	8,0 ± 0,2 ^a	7,7 ± 0,6 ^a
Etanol (g/L)	82,0 ± 4,4 ^a	82,8 ± 8,8 ^a	87,5 ± 0,7 ^a	81,4 ± 5,8 ^a
pH final	3,43 ± 0,07 ^a	3,48 ± 0,01 ^{ab}	3,53 ± 0,07 ^b	3,68 ± 0,02 ^c
°Brix final	11,5	12,0	12,5	14,3

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Os resultados finais apresentados na Tabela 10 demonstraram concentrações residuais muito reduzidas de glicose e frutose (<1 g/L), confirmando consumo eficiente destes monossacarídeos. Em contrapartida, sacarose e maltose mantiveram-se praticamente inalteradas em todos os tratamentos (17,48 - 17,83 g/L), indicando ausência de atividade enzimática suficiente para hidrólise eficiente destes dissacarídeos nas condições experimentais utilizadas.

Neste contexto, a malteação revelou-se particularmente importante, uma vez que promoveu a ativação de enzimas amilolíticas responsáveis pela conversão parcial do amido em açúcares fermentescíveis. Este processo aumentou a disponibilidade de substratos metabólicos para as leveduras e favoreceu o desempenho fermentativo.

Observou-se ainda que a suplementação com centeio reduziu significativamente os teores residuais de frutose relativamente ao controle, sugerindo melhoria da assimilação deste açúcar pelas leveduras. Estes resultados corroboram os achados de Mendes-Ferreira *et al.* [73], indicando que o aporte adicional cofatores metabólicos favorece maior vigor celular e utilização mais eficiente dos açúcares fermentáveis.

Verificou-se discrepância entre os valores obtidos pelos métodos DNS e HPLC. Enquanto o DNS indicou concentrações residuais mais elevadas de açúcares redutores, a análise por HPLC demonstrou consumo quase completo de glicose e frutose. Esta diferença poderá estar associada à menor especificidade do método DNS, que quantifica globalmente compostos com capacidade redutora presentes na matriz, incluindo maltose e outros interferentes [124]. Além disso, as condições alcalinas e de aquecimento do ensaio podem favorecer reações secundárias que contribuem para a sobrestimação dos açúcares redutores [125,126].

Os teores finais de etanol variaram entre 81,4 e 87,5 g/L, sem diferenças estatisticamente significativas (p value = 0,5370) entre tratamentos, demonstrando que o

centeio atuou principalmente na aceleração da cinética fermentativa, sem alterar significativamente a eficiência fermentativa do processo.

A produção de glicerol manteve-se estável entre os tratamentos (7,2 - 8,0 g/L), situando-se dentro dos intervalos normalmente descritos para hidromel [127,128]. Estes resultados sugerem ausência de stress osmótico severo [129], mesmo nos tratamentos com maior concentração de sólidos solúveis.

O pH final aumentou ligeiramente com a suplementação de centeio, variando de 3,43 no controle até 3,68 na formulação com 5%. Este comportamento poderá estar associado à maior capacidade tamponante conferida pelos compostos nitrogenados e minerais presentes no centeio [130]. Ainda assim, todos os valores permaneceram dentro dos intervalos normalmente descritos para bebidas fermentadas semelhantes [22,131,132].

Por fim, o aumento do °Brix final (de 11,5 no controle para 14,3 no centeio 5%) é reflexo do incremento de dextrinas e sólidos solúveis do centeio que não são fermentescíveis, não representando ineficiência metabólica, mas sim a natureza da matriz utilizada.

Portanto, nota-se que a suplementação com centeio não apenas acelerou o esgotamento dos açúcares fermentescíveis, mas também otimizou a performance metabólica da *Saccharomyces cerevisiae* em um meio complexo, superando as limitações nutricionais inerentes ao controle.

3.3.4 Acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total

Os valores de acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total (SO₂), bem como as suas diferenças estatisticamente significativas, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Efeito da adição de centeio na acidez total, acidez volátil e dióxido de enxofre total do hidromel.

Amostras	Acidez total (g/L de ácido tartárico)	Acidez volátil (g/L de ácido acético)	SO ₂ total (mg/L)
Controle	3,43 ± 0,02 ^a	0,51 ± 0,1 ^a	11,52 ± 0,9 ^b
Centeio 1%	3,43 ± 0,02 ^a	0,85 ± 0,1 ^b	12,48 ± 1,3 ^{ab}
Centeio 2%	3,53 ± 0,04 ^a	0,93 ± 0,04 ^b	10,88 ± 0,9 ^{ab}

Centeio 5%	3,41 ± 0,05 ^a	0,94 ± 0,02 ^b	15,68 ± 0,4 ^a
------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

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

A acidez total não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, variando entre 3,41 e 3,53 g/L de ácido tartárico. Esses valores estão dentro da faixa típica reportada para hidroméis, geralmente compreendidos entre 3,0 e 7,0 g/L [73], indicando que a suplementação com centeio não alterou significativamente as vias metabólicas primárias responsáveis pela produção de ácidos orgânicos. Este comportamento sugere que as alterações na composição nutricional do meio não foram suficientes para modificar de forma relevante o equilíbrio ácido da matriz fermentativa [69].

Por outro lado, a acidez volátil aumentou significativamente com a adição de centeio, passando de 0,51 g/L no controle para valores entre 0,85 e 0,94 g/L nos tratamentos com centeio. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de centeio, indicando que mesmo a menor percentagem adicionado de centeio foi suficiente para promover o aumento da acidez volátil. Embora estes valores permaneçam abaixo do limite tecnológico normalmente aceito para hidromel (~1,4 g/L), encontram-se acima da faixa frequentemente associada a melhor qualidade sensorial [69].

Este aumento poderá estar relacionado com a maior disponibilidade de nutrientes provenientes do centeio, que pode ter intensificado a atividade fermentativa e alterado o metabolismo da levedura, favorecendo a formação de subprodutos como ácidos orgânicos [133]. Entre estes, o ácido acético é particularmente relevante por representar a principal fração da acidez volátil e por exercer impacto sensorial quando presente em concentrações elevadas [77].

Relativamente ao dióxido de enxofre total (SO₂), os valores obtidos variaram entre 10,88 e 15,68 mg/L, sendo observada diferença estatisticamente significativa apenas no tratamento com 5% de centeio. De forma geral, os valores encontrados são baixos e consistentes com o perfil típico do hidromel, que apresenta concentrações reduzidas de SO₂ quando comparado a bebidas vínicas [73,134].

De acordo com estudos sobre hidromel, a presença de SO₂ está frequentemente associada à produção endógena pelas leveduras durante a fermentação, uma vez que este composto pode ser formado como intermediário do metabolismo do enxofre [135].

No hidromel, contudo, a utilização deste composto tende a ser mais limitada, uma vez que o mel possui naturalmente compostos com atividade antimicrobiana, reduzindo a necessidade de concentrações elevadas de SO₂ [136].

De forma integrada, os resultados demonstram que o centeio atuou como fonte nutricional capaz de modular o metabolismo fermentativo, promovendo aumento da produção de metabolitos secundários, particularmente ácido acético, sem alterar significativamente a acidez total. Estes resultados corroboram estudos que demonstram que a suplementação nutricional pode melhorar o desempenho fermentativo, influenciando simultaneamente parâmetros químicos e sensoriais da bebida [137].

Assim, embora a utilização de centeio se apresente como uma alternativa promissora à suplementação convencional, os resultados de acidez volátil sugerem que sua aplicação deve ser cuidadosamente controlada, sendo concentrações intermediárias mais adequadas para equilibrar eficiência fermentativa e qualidade final da bebida.

3.3.5 Teor alcóolico e eficiência fermentativa

A Tabela 12 apresenta o efeito da adição de diferentes concentrações de centeio (1%, 2% e 5%) nos teores de etanol e na eficiência fermentativa após o processo de fermentação, em comparação com a amostra controle.

Tabela 12 - Efeito da adição de centeio na produção de etanol e eficiência fermentativa.

Amostras	Etanol (°GL ± DP)	Eficiência fermentativa (% ± DP)
Controle	10,40±0,56 ^a	83,44±1,32 ^a
Centeio 1%	10,51±1,12 ^a	82,77±2,48 ^a
Centeio 2%	11,10±0,09 ^a	85,16±0,94 ^a
Centeio 5%	10,32±0,74 ^a	85,50±3,61 ^a

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

Os resultados apresentados indicam que a adição de centeio nas concentrações avaliadas (1%, 2% e 5%) não promoveram diferenças estatisticamente significativas na concentração final de etanol e na eficiência fermentativa. Esses achados demonstram que

a suplementação do mosto não alterou de forma significativa os parâmetros finais da fermentação nas condições estudadas.

Os valores de etanol foram semelhantes entre todos os tratamentos, indicando que a fermentação atingiu níveis finais comparáveis independentemente da adição de centeio. Da mesma forma, a eficiência fermentativa permaneceu estatisticamente inalterada, indicando que o desempenho do processo foi mantido entre os tratamentos.

Apesar da ausência de diferenças estatísticas, observa-se uma tendência de valores ligeiramente superiores de etanol e eficiência fermentativa nos tratamentos com 2% e 5% de centeio, o que pode indicar um possível efeito positivo da suplementação. No entanto, essa variação não foi suficientemente expressiva para ser confirmada.

Nesse contexto, é importante considerar que o efeito da adição de centeio pode estar mais relacionado à cinética da fermentação do que aos parâmetros finais de rendimento. O aumento na disponibilidade de açúcares fermentescíveis pode ter favorecido uma maior atividade metabólica das leveduras nas fases iniciais do processo, contribuindo para uma aceleração da fermentação. Esse comportamento é consistente com a redução do tempo de duplicação celular observada com o acréscimo progressivo de centeio (tópico 3.3.1), o que sugere maior velocidade de crescimento das leveduras.

Assim, embora os tratamentos tenham apresentado valores finais semelhantes de etanol e eficiência fermentativa, a suplementação com centeio poderá reduzir o tempo necessário para conclusão da fermentação, otimizando o processo sem comprometer a eficiência da fermentação.

3.3.6 Bioatividade do hidromel

A Tabela 13 apresenta o efeito da adição de diferentes concentrações de centeio nos teores de compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante dos hidroméis.

Tabela 13 - Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/mL) e capacidade antioxidante (mg Fe²⁺/mL) em hidromel com diferentes concentrações de centeio.

Amostras	Compostos fenólicos totais	FRAP
	(mg EAG/mL ± DP)	(mg EFeII/mL ± DP)
Controle	5,50 ± 0,2 ^a	1,46 ± 0,04 ^b
Centeio 1%	6,55 ± 0,01 ^b	1,53 ± 0,07 ^b

Centeio 2%	$7,40 \pm 0,2^c$	$1,68 \pm 0,06^b$
Centeio 5%	$9,91 \pm 0,08^d$	$1,82 \pm 0,03^a$

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

A adição de centeio promoveu um aumento significativo no teor de compostos fenólicos totais do hidromel, conforme evidenciado pelos resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. Como observa-se na Tabela 13, nota-se uma tendência crescente com o aumento da concentração de centeio, passando de $5,50 \pm 0,2$ mg EAG/mL no controle para $9,91 \pm 0,08$ mg EAG/mL na formulação com 5% de centeio. Além disso, as diferenças estatísticas entre as amostras confirmam que cada nível de adição resultou em incrementos significativos, sugerindo um efeito dependente da concentração de centeio.

Esse comportamento pode ser atribuído à composição do centeio, que é naturalmente rico em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos ligados à parede celular [56], como pode-se observar no tópico 3.2.3. O processo de malteação intensifica a atividade enzimática, promovendo a liberação desses compostos previamente ligados, aumentando sua disponibilidade [64].

De forma semelhante, a capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP também apresentou aumento com a adição de centeio, embora com menor magnitude em comparação aos fenólicos totais. Os valores passaram de $1,46 \pm 0,04$ mg Fe^{2+} /mL no controle para $1,82 \pm 0,03$ mg Fe^{2+} /mL na formulação com 5% de centeio. No entanto, diferentemente dos fenólicos, as amostras intermediárias (1% e 2%) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, indicando que o efeito do centeio sobre a capacidade antioxidante só se torna mais evidente em concentrações mais elevadas.

Entretanto, à semelhança do observado na caracterização do centeio, deve-se considerar que os valores de compostos fenólicos totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu podem estar superestimados [113,114]. Como já citado, esse método pode também quantificar outras substâncias com capacidade redutora, como açúcares redutores, produtos intermediários da fermentação e outros compostos presentes na matriz do hidromel. Dessa forma, parte do aumento observado pode refletir não apenas a presença de compostos fenólicos, mas também a contribuição desses compostos interferentes.

Apesar dessa limitação, essa possível superestimação não compromete a interpretação do comportamento observado entre as amostras. Isso porque o aumento dos

valores de compostos fenólicos com a adição de centeio segue uma tendência consistente e progressiva, sendo corroborado pelos resultados de capacidade antioxidante obtidos pelo método FRAP. A concordância entre ambos os ensaios sugere que o incremento observado está, de fato, associado ao aumento de compostos com atividade redutora, incluindo compostos fenólicos, e não apenas a interferências analíticas.

Para avaliar possíveis interações entre a matriz fermentativa do hidromel e os compostos provenientes do centeio, foi analisado o efeito sinérgico com base na comparação entre os valores observados experimentalmente e os valores esperados, calculados a partir da soma do controle com a contribuição do centeio determinada em ensaio de fermentação separado sem o mel, o resultado foi apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Índice de sinergia (SI) para compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (FRAP) em hidromel com adição de centeio.

Amostras	SI (Fenólicos)	SI (FRAP)
Centeio 2%	1,19	1,03
Centeio 5%	1,46	1,05

SI = valor observado / valor esperado; SI > 1 indica efeito sinérgico.

Os resultados demonstraram que, para os compostos fenólicos totais, os valores observados nas formulações com 2% e 5% de centeio foram superiores aos valores esperados, resultando em índices de sinergia superiores a 1. Esse comportamento é indicativo da ocorrência de efeito sinérgico, sugerindo que a interação entre a matriz do hidromel e os constituintes do centeio promovem um aumento adicional de compostos com capacidade redutora, além do esperado por simples efeito aditivo.

Esse efeito pode ser explicado por diferentes mecanismos associados ao processo fermentativo. A atividade metabólica das leveduras pode contribuir para a liberação de compostos fenólicos ligados à matriz do centeio, através da ação de enzimas como glicosidases [138]. Além disso, a fermentação pode promover a biotransformação de compostos fenólicos em formas mais reativas ou mais facilmente detectáveis pelo método analítico, aumentando a resposta obtida [139]. Também é possível que ocorram interações entre compostos provenientes do mel e do centeio, resultando na formação de novos compostos com maior capacidade redutora [140].

Para a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP, também se observou efeito predominantemente aditivo, com ligeira tendência sinérgica. Os valores observados

foram ligeiramente superiores aos esperados, indicando que o efeito sinérgico existe, mas é menos pronunciado quando comparado aos compostos fenólicos totais.

Assim, os resultados indicam que a adição de centeio não só contribui diretamente com compostos bioativos, mas também promove interações sinérgicas durante a fermentação, potenciando o valor funcional do hidromel. Esse efeito é particularmente evidente em níveis mais elevados de incorporação, como observado na formulação com 5% de centeio.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o mel multifloral escuro utilizado apresentou qualidade físico-química adequada para aplicação fermentativa, com parâmetros dentro dos limites estabelecidos pela legislação e literatura, evidenciando aptidão tecnológica para a produção de hidromel.

A malteação do centeio ibérico promoveu alterações relevantes na composição do cereal, aumentando a disponibilidade de açúcares fermentáveis, compostos bioativos e nitrogênio assimilável. Estas modificações reforçam o potencial tecnológico do centeio maltado como ingrediente complementar em mostos de hidromel, contribuindo para suprir parcialmente limitações nutricionais características do mel.

A incorporação de centeio maltado favoreceu o desempenho fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae*, sobretudo nas etapas iniciais da fermentação, refletindo-se na tendência de aceleração da cinética fermentativa e no comportamento do consumo de açúcares. Estes resultados indicam que o enriquecimento do mosto com centeio maltado proporcionou melhores condições nutricionais ao metabolismo das leveduras.

Apesar das diferenças observadas durante a fermentação, os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos valores finais de etanol e eficiência fermentativa, demonstrando que a suplementação com centeio não comprometeu o desempenho do processo fermentativo nas condições estudadas.

Relativamente aos parâmetros físico-químicos, verificou-se influência da adição do centeio maltado sobre a acidez total e a acidez volátil dos hidroméis. Embora os tratamentos suplementados tenham apresentado aumento da acidez volátil, os valores obtidos mantiveram-se compatíveis com a estabilidade da bebida, não indicando comprometimento da qualidade fermentativa.

A adição de centeio maltado promoveu ainda aumento significativo dos compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante dos hidroméis, especialmente nos tratamentos com maiores concentrações de centeio.

Contudo, os resultados demonstram a necessidade de ponderação entre o incremento bioativo e os impactos tecnológicos associados à utilização de maiores concentrações de centeio, uma vez que estas também influenciaram parâmetros físico-químicos importantes da bebida, como acidez volátil e nitrogênio assimilável.

De forma geral, conclui-se que o centeio ibérico maltado apresenta elevado potencial de aplicação na produção de hidromel, atuando simultaneamente como fonte complementar de nutrientes fermentativos e como ingrediente de enriquecimento

bioativo. A utilização deste cereal representa, assim, uma estratégia promissora para o desenvolvimento de hidroméis inovadores e para a valorização de matérias-primas regionais.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a realização de análises sensoriais, estudos de maturação e estabilidade, bem como a caracterização detalhada do perfil aromático dos hidroméis produzidos, permitindo uma avaliação mais abrangente da qualidade e aceitação da bebida final.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida ELMD, Teixeira PO, Macêdo SS, Eller MR. Higher proportions of hopped barley malt enhance antioxidant activity and phenolic compounds in braggots. *J Food Sci Technol*. 2025;62:2333–41. doi:10.1007/s13197-024-06173-z
2. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*. 2016;196:309–23. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.051
3. Schwarz LV, Marcon AR, Delamare APL, Agostini F, Moura S, Echeverrigaray S. Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *J Food Sci Technol*. 2020;57:2840–51. doi:10.1007/s13197-020-04316-6
4. Almeida ELMD, Moreira E Silva G, Vassalli IDA, Silva MS, Santana WC, Silva PHAD, et al. Effects of nitrogen supplementation on *Saccharomyces cerevisiae* JP14 fermentation for mead production. *Food Sci Technol*. 2020;40:336–43. doi:10.1590/fst.11219
5. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. *J Inst Brew*. 2015;121:122–8. doi:10.1002/jib.184
6. Chitarrini G, Debiasi L, Stuffer M, Ueberegger E, Zehetner E, Jaeger H, et al. Volatile Profile of Mead Fermenting Blossom Honey and Honeydew Honey with or without *Ribes nigrum*. *Molecules*. 2020;25:1818. doi:10.3390/molecules25081818
7. Santos PCD, Nascimento ASD, Sodré GDS, Carvalho CALD, Alves RMDO, Ferreira MA, et al. Pollen spectrum of honey of *Apis mellifera* L. and stingless bees (Hymenoptera: Apidae) from the semi-arid region of Bahia State, Brazil. *Grana*. 2020;59:377–88. doi:10.1080/00173134.2020.1733074
8. Scholz MBDS, Quinhone Júnior A, Delamuta BH, Nakamura JM, Baudraz MC, Reis MO, et al. Indication of the geographical origin of honey using its physicochemical characteristics and multivariate analysis. *J Food Sci Technol*. 2020;57:1896–903. doi:10.1007/s13197-019-04225-3
9. Pereira AP, Oliveira JM, Mendes-Ferreira A, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Mead and Other Fermented Beverages. Em: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier; 2017. p. 407–34. doi:10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5
10. Sroka P, Satora P. The influence of hydrocolloids on mead wort fermentation. *Food Hydrocoll*. 2017;63:233–9. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.08.044
11. Kranz B, Koch M, Schapfl M, Fischer L. Germinating of Barley and Wheat Grains with a Design of Experiments for the Production of Hydrolases. *Food Technol Biotechnol*. 2015;53. doi:10.17113/ftb.53.02.15.3718

12. Gunathunga C, Senanayake S, Jayasinghe MA, Brennan CS, Truong T, Marapana U, et al. Germination effects on nutritional quality: A comprehensive review of selected cereals and pulses changes. *J Food Compos Anal.* 2024;128:106024. doi:10.1016/j.jfca.2024.106024
13. Al-Taher F, Nemzer B. Effect of Germination on Fatty Acid Composition in Cereal Grains. *Foods.* 2023;12:3306. doi:10.3390/foods12173306
14. Biazus JPM, Souza RRD, Márquez JE, Franco TT, Santana JCC, Tambourgi EB. Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. *Braz Arch Biol Technol.* 2009;52:991–1000. doi:10.1590/S1516-89132009000400024
15. Almaguer C, Kollmannsberger H, Gastl M, Becker T. Influence of the malting conditions on the modification and variation in the physicochemical properties and volatile composition of barley (*Hordeum vulgare* L.), rye (*Secale cereale* L.), and quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) malts. *Food Res Int.* 2024;196:114965. doi:10.1016/j.foodres.2024.114965
16. Calvi A, Preiti G, Poiana M, Marconi O, Gastl M, Zarnkow M. Multi-Response Optimization of the Malting Process of an Italian Landrace of Rye (*Secale cereale* L.) Using Response Surface Methodology and Desirability Function Coupled with Genetic Algorithm. *Foods.* 2022;11:3561. doi:10.3390/foods11223561
17. Codex Standard for Honey (CODEX STAN 12-1981). FAO/WHO Codex Alimentarius Commission; 1981. Relatório CODEX STAN 12-1981.
18. Popescu A, Dinu TA, Stoian E, Serban V. Beehives and Honey Production – A Brief Statistics in the World and European Union 2000–2022. *AGRIS.* 2024;24:655–76.
19. Pawlewicz A, Bórawski P, Parzonko A. Food Self-Sufficiency in the Honey Market in Poland. *Sustainability.* 2024;16:9373. doi:10.3390/su16219373
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Honey and Beeswax Statistics. FAO; 2025. <https://www.fao.org/forestry/nwfp/statistics/honey-and-beeswax/en>
21. Honey production in the European Union. European Commission; 2024. https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/honey_en
22. Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LBD, Sancho MT, Pascual-Maté A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Res.* 2018;57:5–37. doi:10.1080/00218839.2017.1338444
23. Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bachir Bey M, Djoudad-Kadji H, Louaileche H. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.* 2010;121:561–8. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.047
24. Portugal. Decreto-Lei n.º 214/2003 de 18 de setembro. 2003.
25. Kozłowicz K, Różyło R, Gładyszewska B, Matwijczuk A, Gładyszewski G, Chocyk D, et al. Identification of sugars and phenolic compounds in honey

- powders with the use of GC–MS, FTIR spectroscopy, and X-ray diffraction. *Sci Rep.* 2020;10:16269. doi:10.1038/s41598-020-73306-7
26. Machado AM, Tomás A, Russo-Almeida P, Duarte A, Antunes M, Vilas-Boas M, et al. Quality assessment of Portuguese monofloral honeys. Physicochemical parameters as tools in botanical source differentiation. *Food Res Int.* 2022;157:111362. doi:10.1016/j.foodres.2022.111362
 27. Hasam S, Qarizada D, Azizi M. A Review: Honey and Its Nutritional Composition. *Asian J Res Biochem.* 2020;34–43. doi:10.9734/ajrb/2020/v7i330142
 28. Kim TK, Atigadda V, Brzeminski P, Fabisiak A, Tang EKY, Tuckey RC, et al. Detection of 7-Dehydrocholesterol and Vitamin D3 Derivatives in Honey. *Molecules.* 2020;25:2583. doi:10.3390/molecules25112583
 29. Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* 2009;114:1438–43. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.028
 30. Ciulu M, Spano N, Pilo M, Sanna G. Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. *Molecules.* 2016;21:451. doi:10.3390/molecules21040451
 31. Escuredo O, Dobre I, Fernández-González M, Seijo MC. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 2014;149:84–90. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.097
 32. Berthels N, Cordero R, Bauer F, Thevelein J, Pretorius I. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 2004;4:683–9. doi:10.1016/j.femsyr.2004.02.005
 33. D’Amore T, Russell I, Stewart GG. Sugar utilization by yeast during fermentation. *J Ind Microbiol.* 1989;4:315–23. doi:10.1007/BF01577355
 34. Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res.* 2005;11:139–73. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
 35. Jose-Salazar JA, Ballinas-Cesatti CB, Hernández-Martínez DM, Cristiani-Urbina E, Melgar-Lalanne G, Morales-Barrera L. Kinetic Evaluation of the Production of Mead from a Non-Saccharomyces Strain. *Foods.* 2024;13:1948. doi:10.3390/foods13121948
 36. Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Falco V, Leão C, Mendes-Faia A. The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36:571–83. doi:10.1007/s10295-009-0527-x

37. Christofi S, Papanikolaou S, Dimopoulou M, Terpou A, Cioroiu IB, Cotea V, et al. Effect of Yeast Assimilable Nitrogen Content on Fermentation Kinetics, Wine Chemical Composition and Sensory Character in the Production of Assyrtiko Wines. *Appl Sci*. 2022;12:1405. doi:10.3390/app12031405
38. Li J, Yuan M, Meng N, Li H, Sun J, Sun B. Influence of nitrogen status on fermentation performances of non- *Saccharomyces* yeasts: a review. *Food Sci Hum Wellness*. 2024;13:556–67. doi:10.26599/FSHW.2022.9250050
39. Tesnière C, Brice C, Blondin B. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99:7025–34. doi:10.1007/s00253-015-6810-z
40. Bell SJ, Henschke PA. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res*. 2005;11:242–95. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x
41. Berbeć AK, Wyzińska M. From Nutrition to Energy: Evaluating the Role of Rye (*Secale cereale* L.) Grain in Sustainable Food Systems and Biofuel Applications. *Foods*. 2025;14:1971. doi:10.3390/foods14111971
42. Ritchie H, Rosado P, Roser M. Rye production. 2023. <https://ourworldindata.org/grapher/rye-production>
43. Ikram A, Saeed F, Noor RA, Imran A, Afzaal M, Rasheed A, et al. A comprehensive review on biochemical and technological properties of rye (*Secale cereale* L.). *Int J Food Prop*. 2023;26:2212–28. doi:10.1080/10942912.2023.2244697
44. Hansen HB, Møller B, Andersen SB, Jørgensen JR, Hansen Å. Grain Characteristics, Chemical Composition, and Functional Properties of Rye (*Secale cereale* L.) As Influenced by Genotype and Harvest Year. *J Agric Food Chem*. 2004;52:2282–91. doi:10.1021/jf0307191
45. Makran M, Cilla A, Haros C, Garcia-Llatas G. Enrichment of Wholemeal Rye Bread with Plant Sterols: Rheological Analysis, Optimization of the Production, Nutritional Profile and Starch Digestibility. *Foods*. 2022;12:93. doi:10.3390/foods12010093
46. Warechowska M, Warechowski J, Tyburski J, Siemianowska E, Nawrocka A, Miś A, et al. Evaluation of physicochemical properties, antioxidant potential and baking quality of grain and flour of primitive rye (*Secale cereale* var. Multicaule). *J Food Sci Technol*. 2019;56:3422–30. doi:10.1007/s13197-019-03827-1
47. Xhaferaj M, Muskovics G, Schall E, Bugyi Z, Tömösközi S, Scherf KA. Characterization of rye flours and their potential as reference material for gluten analysis. *Food Chem*. 2023;408:135148. doi:10.1016/j.foodchem.2022.135148
48. Cardoso RVC, Fernandes Â, Heleno SA, Rodrigues P, González-Paramás AM, Barros L, et al. Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chem*. 2019;280:123–9. doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.063

49. Drakos A, Kyriakakis G, Evageliou V, Protonotariou S, Mandala I, Ritzoulis C. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. *Food Chem.* 2017;215:326–32. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.169
50. Hernández-Becerra E, Contreras-Jiménez B, Vuelas-Solorzano A, Millan-Malo B, Muñoz-Torres C, Oseguera-Toledo ME, et al. Physicochemical and morphological changes in corn grains and starch during the malting for Palomero and Puma varieties. *Cereal Chem.* 2020;97:404–15. doi:10.1002/cche.10256
51. Kołodziejczyk P, Michniewicz J, Buchowski MS, Paschke H. Effects of fibre-rich rye milling fraction on the functional properties and nutritional quality of wholemeal rye bread. *J Food Sci Technol.* 2020;57:222–32. doi:10.1007/s13197-019-04050-8
52. Klupsaite D, Starkute V, Zokaityte E, Cernauskas D, Mockus E, Kentra E, et al. The Contribution of Scalded and Scalded-Fermented Rye Wholemeal Flour to Quality Parameters and Acrylamide Formation in Semi-Wheat-Rye Bread. *Foods.* 2023;12:937. doi:10.3390/foods12050937
53. Murniece R, Reidzane S, Radenkovs V, Matisons R, Dabina-Bicka I, Klava D, et al. Impact of Rye Malt with Various Diastatic Activity on Wholegrain Rye Flour Rheology and Sugar Formation in Scalding and Fermentation Processes. *Foods.* 2024;13:2077. doi:10.3390/foods13132077
54. Zadeike D, Copperstone C, Aleksandrova O, Ünal DÖ, Šavikin K, Živković J, et al. Rye (*Secale cereale* L.) revisited—nutritional composition, functional benefits, and role in sustainable diets. *Front Nutr.* 2025;12:1666455. doi:10.3389/fnut.2025.1666455
55. Dzikowski D. Rye Flour and Rye Bran: New Perspectives for Use. *Processes.* 2022;10:293. doi:10.3390/pr10020293
56. Kaur P, Sandhu KS, Bangar SP, Purewal SS, Kaur M, Ilyas RA, et al. Unraveling the Bioactive Profile, Antioxidant and DNA Damage Protection Potential of Rye (*Secale cereale*) Flour. *Antioxidants.* 2021;10:1214. doi:10.3390/antiox10081214
57. Motlhanka K, Lebani K, Boekhout T, Zhou N. Fermentative Microbes of Khadi, a Traditional Alcoholic Beverage of Botswana. *Fermentation.* 2020;6:51. doi:10.3390/fermentation6020051
58. Ospankulova G, Temirova I, Toimbayeva D, Saduakhasova S, Tazhina S, Khamitova D, et al. The Effect of Germination Duration on the Biochemical Indicators and Functional-Technological Properties of Triticale Grain. *Appl Sci.* 2025;15:5596. doi:10.3390/app15105596
59. Hertrich. Topics in Brewing: Malting. *Tech Q.* 2013. doi:10.1094/TQ-50-4-1120-01
60. Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9:318–28. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x

61. Fox GP, Bettenhausen HM. Variation in quality of grains used in malting and brewing. *Front Plant Sci.* 2023;14:1172028. doi:10.3389/fpls.2023.1172028
62. Rani H, Standish A, Walling JG, Whitcomb SJ. Development and quality assessment of low-cost benchtop malting protocol for laboratory-scale barley (*Hordeum vulgare* L.) malt quality evaluation. *J Cereal Sci.* 2025;123:104138. doi:10.1016/j.jcs.2025.104138
63. Filipowska W, Jaskula-Goiris B, Ditrych M, Bustillo Trueba P, De Rouck G, Aerts G, et al. On the contribution of malt quality and the malting process to the formation of beer staling aldehydes: a review. *J Inst Brew.* 2021;127:107–26. doi:10.1002/jib.644
64. Contreras-Jiménez B, Del Real A, Millan-Malo BM, Gaytán-Martínez M, Morales-Sánchez E, Rodríguez-García ME. Physicochemical changes in barley starch during malting: Physicochemical changes in barley starch during malting. *J Inst Brew.* 2019;125:10–7. doi:10.1002/jib.547
65. Kalb V, Seewald T, Hofmann T, Granvogl M. The malting parameters: steeping, germination, withering, and kilning temperature and aeration rate as possibilities for styrene mitigation in wheat beer. *Eur Food Res Technol.* 2022;248:69–84. doi:10.1007/s00217-021-03852-5
66. Qin Q, Zhang L, Yin H, Yu J, Hu S, Zhang Z, et al. Enhancing malting performance of harder barley varieties through ultrasound treatment. *Ultrason Sonochem.* 2024;105:106860. doi:10.1016/j.ultsonch.2024.106860
67. Webster CE, Barker D, Deed RC, Pilkington LI. Mead production and quality: A review of chemical and sensory mead quality evaluation with a focus on analytical methods. *Food Res Int.* 2025;202:115655. doi:10.1016/j.foodres.2024.115655
68. Yorke J, Cook D, Ford R. Brewing with Unmalted Cereal Adjuncts: Sensory and Analytical Impacts on Beer Quality. *Beverages.* 2021;7:4. doi:10.3390/beverages7010004
69. Kawa-Rygielska J, Adamenko K, Kucharska AZ, Szatkowska K. Fruit and herbal meads – Chemical composition and antioxidant properties. *Food Chem.* 2019;283:19–27. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.040
70. Trade Data Monitor, World Integrated Trade Solution (WITS). Global trade flows of fermented beverages (HS 2206). World Bank; 2023. <https://wits.worldbank.org>
71. Pascoal A, Anjos O, Feás X, Oliveira JM, Estevinho LM. Impact of fining agents on the volatile composition of sparkling mead: Impact of fining agents on the volatile composition of sparkling mead. *J Inst Brew.* 2017;125:125–33. doi:10.1002/jib.549
72. Reitenbach A, Lorenzi A, Ghesti G, Santos P, Rodrigues I, Barbosa A, et al. Advances in Mead Aroma Research: A Comprehensive Bibliometric Review and Insights into Key Factors and Trends. *Fermentation.* 2025;11:226. doi:10.3390/fermentation11040226

73. Mendes-Ferreira A, Cosme F, Barbosa C, Falco V, Inês A, Mendes-Faia A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int J Food Microbiol.* 2010;144:193–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016
74. Akalın H, Bayram M, Anlı RE. Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey: Properties of mead from different types of honey. *J Inst Brew.* 2017;123:167–74. doi:10.1002/jib.396
75. Nedyalkov P, Qnkova-Nikolova A, Kolev N, Vlahova-Vangelova D. Sensory and antioxidant properties of mead with added beehive products. *Food Sci Appl Biotechnol.* 2024;7:231. doi:10.30721/fsab2024.v7.i2.346
76. Balogu T, Towobola O. Production and Quality Analysis of Wine from Honey and Coconut Milk Blend Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation.* 2017;3:16. doi:10.3390/fermentation3020016
77. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Dias LG, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Volatile Composition and Sensory Properties of Mead. *Microorganisms.* 2019;7:404. doi:10.3390/microorganisms7100404
78. von der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. Harmonized Methods of Melissopalynology. *Apidologie.* 2004;35:S18–25. doi:10.1051/apido:2004050
79. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of Melissopalynology. *Bee World.* 1978;59:139–57. doi:10.1080/0005772X.1978.11097714
80. Anónimos. Métodos oficiales de análisis para la miel. 1986.
81. Megazyme (Neogen). Diastase Activity in Honey (Amylzyme Method) (T-AMZHY). Megazyme International Ireland; 2024. <https://prod-media.megazyme.com/media/pdf/97/5a/62/T-AMZHY.pdf>
82. AOAC. Em: Official Methods of Analysis. 15° ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists; 1990.
83. Bogdanov S, Martin P, Lüllmann C. Harmonised methods of the European Honey Commission. V. 28. EDP Sciences; 1997.
84. Sancho MT, Muniategui S, Sánchez P, Huidobro JF, Simal J. Mieles del Pais Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *An Bromatol.* 1991;XLIII:311–24.
85. AOAC International. Official Method 923.03: Ash of Flour. Em: Official Methods of Analysis of AOAC International. 17° ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International; 2000.
86. FAO. Food Energy: Methods of Analysis and Conversion Factors. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2003.

87. Makhoul FZ, Squeo G, Barkat M, Pasqualone A, Caponio F. Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of *Quercus* fruit: flour and oil. *North Afr J Food Nutr Res*. 2019;3:148–55. doi:10.51745/najfnr.3.5.148-155
88. Socha R, Pająk P, Fortuna T, Buksa K. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Polish Meads. *Int J Food Prop*. 2015;18:2713–25. doi:10.1080/10942912.2015.1004588
89. Shaghghi S, Beheshty MH, Rahimi H. PREPARATION AND RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHENOLIC/GLASS PREPREGS. *Iran Polym J*. 2011;20.
90. Paula V, Pedro SI, Campos MG, Delgado T, Estevinho LM, Anjos O. Special Bioactivities of Phenolics from *Acacia dealbata* L. with Potential for Dementia, Diabetes and Antimicrobial Treatments. *Appl Sci*. 2022;12:1022. doi:10.3390/app12031022
91. Berker KI, Güçlü K, Tor İ, Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*. 2007;72:1157–65. doi:10.1016/j.talanta.2007.01.019
92. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. *J Inst Brew*. 2015;121:405–10. doi:10.1002/jib.239
93. Aerny J. Composés azotes des moûts et des vins. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic*. 1996;28:161–5.
94. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003: Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília, DF: Diário Oficial da União; 2003. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>
95. OIV – Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Recueil des méthodes internationales d’analyse des vins et des moûts. Paris, France: OIV; 2006.
96. Maldonado IR, Carvalho PGB de, Ferreira NA. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Brasília, DF: EMBRAPA; 2013.
97. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). Sulfur dioxide (iodometry) (Type-IV). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. OIV.
98. Curvelo-Garcia AS. Determinação de dióxido de enxofre total (SO₂) em hidromel por titulação iodométrica (método Ripper). Curvelo-Garcia AS, Barros P, organizadores. *Práticas Enológicas Internacionalmente Reconhecidas – Química Analítica*. Quântica Editora; 1998.
99. Yuan S, Chen H. Mathematical rules for synergistic, additive, and antagonistic effects of multi-drug combinations and their application in research and

- development of combinatorial drugs and special medical food combinations. *Food Sci Hum Wellness*. 2019;8:136–41. doi:10.1016/j.fshw.2019.01.003
100. Chang YH, Chang KS, Chen CY, Hsu CL, Chang TC, Jang HD. Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. *Fermentation*. 2018;4:45. doi:10.3390/fermentation4020045
 101. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2025. <https://www.R-project.org/>
 102. Fox J, Weisberg S. An R Companion to Applied Regression. Third. Thousand Oaks CA: Sage; 2019. <https://www.john-fox.ca/Companion/>
 103. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. 2025. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix> doi:10.32614/CRAN.package.rstatix
 104. Vîjan LE, Mazilu IC, Enache C, Enache S, Topală CM. Botanical Origin Influence on Some Honey Physicochemical Characteristics and Antioxidant Properties. *Foods*. 2023;12:2134. doi:10.3390/foods12112134
 105. Doolan O, Lewsey MG, Peirats-Llobet M, Bricklebank N, Aberdein N. Micro computed tomography analysis of barley during the first 24 hours of germination. *Plant Methods*. 2024;20:142. doi:10.1186/s13007-024-01266-4
 106. Jin X, Yang H, Chen M, Coldea TE, Zhao H. Improved osmotic stress tolerance in brewer's yeast induced by wheat gluten peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106:4995–5006. doi:10.1007/s00253-022-12073-z
 107. Tian T, Yang C, Wu JL, Liu S. Zn²⁺ supplementation-mediated IZH4 enhances acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* via membrane lipid remodeling: A multi-omics study. *Food Chem Mol Sci*. 2025;11:100324. doi:10.1016/j.fochms.2025.100324
 108. Pejcz E, Lachowicz-Wiśniewska S, Nowicka P, Wojciechowicz-Budzisz A, Harasym J. Enhancing antioxidant activity and modulating FODMAPs levels in inoculated sourdough rye bread. *LWT*. 2024;197:115905. doi:10.1016/j.lwt.2024.115905
 109. Mancino W, Carnevali P, Terzi V, Pérez PG, Zhang L, Giuberti G, et al. Hierarchical Effects of Lactic Fermentation and Grain Germination on the Microbial and Metabolomic Profile of Rye Doughs. *Foods*. 2023;12:998. doi:10.3390/foods12050998
 110. Pihlava JM, Nordlund E, Heiniö RL, Hietaniemi V, Lehtinen P, Poutanen K. Phenolic compounds in wholegrain rye and its fractions. *J Food Compos Anal*. 2015;38:89–97. doi:10.1016/j.jfca.2014.10.004
 111. Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen Å, Meyer AS. Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins. *J Agric Food Chem*. 2001;49:4090–6. doi:10.1021/jf0101758

112. Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*. 2020;9:709. doi:10.3390/antiox9080709
113. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *J Agric Food Chem*. 2010;58:8139–44. doi:10.1021/jf1005935
114. Lawag IL, Nolden ES, Schaper AAM, Lim LY, Locher C. A Modified Folin–Ciocalteu Assay for the Determination of Total Phenolics Content in Honey. *Appl Sci*. 2023;13:2135. doi:10.3390/app13042135
115. Adebo OA, Gabriela Medina-Meza I. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules*. 2020;25:927. doi:10.3390/molecules25040927
116. Shewry PR, Kreis M, Burgess SR, Parmar S, Mifflin BJ. The synthesis and deposition of the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Planta*. 1983;159:439–45. doi:10.1007/BF00392080
117. Bahmani M, Juhász A, Bose U, Nye-Wood MG, Blundell M, Howitt CA, et al. From grain to malt: Tracking changes of ultra-low-gluten barley storage proteins after malting. *Food Chem*. 2024;432:137189. doi:10.1016/j.foodchem.2023.137189
118. Liu J, Chu B, Yang X, Jin Y. Relationship between the index of protein modification (Kolbach index) and degradation of macromolecules in wheat malt. *J Food Sci*. 2021;86:2300–11. doi:10.1111/1750-3841.15701
119. Kamps JJAG, Hopkinson RJ, Schofield CJ, Claridge TDW. How formaldehyde reacts with amino acids. *Commun Chem*. 2019;2:126. doi:10.1038/s42004-019-0224-2
120. Perez M, Luyten K, Michel R, Riou C, Blondin B. Analysis of hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res*. 2005;5:351–61. doi:10.1016/j.femsyr.2004.09.005
121. Nadai C, Crosato G, Giacomini A, Corich V. Different Gene Expression Patterns of Hexose Transporter Genes Modulate Fermentation Performance of Four *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Fermentation*. 2021;7:164. doi:10.3390/fermentation7030164
122. Ramírez-Aroca L, Querol A, Ferreira V, Minebois R. Specific impact of nitrogen supplementation on the metabolism of *Saccharomyces* and hybrids during wine fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2026;445. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111493
123. Palma M, Madeira SC, Mendes-Ferreira A, Sá-Correia I. Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during

- alcoholic fermentation. *Microb Cell Factories*. 2012;11:99. doi:10.1186/1475-2859-11-99
124. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;31:426–8. doi:10.1021/ac60147a030
 125. Negrulescu A, Patrulea V, Mincea MM, Ionascu C, Vlad-Oros BA, Ostafe V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *J Braz Chem Soc*. 2012;23:2176–82. doi:10.1590/S0103-50532013005000003
 126. Wood IP, Elliston A, Ryden P, Bancroft I, Roberts IN, Waldron KW. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass Bioenergy*. 2012;44:117–21. doi:10.1016/j.biombioe.2012.05.003
 127. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Sci Technol*. 2014;56:21–30. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.005
 128. Czabaj S, Kawa-Rygielska J, Kucharska A, Kliks J. Effects of Mead Wort Heat Treatment on the Mead Fermentation Process and Antioxidant Activity. *Molecules*. 2017;22:803. doi:10.3390/molecules22050803
 129. Overkamp KM, Bakker BM, Kötter P, Luttik MAH, Van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic Engineering of Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:2814–21. doi:10.1128/AEM.68.6.2814-2821.2002
 130. Ribeiro-Filho N, Ayed C, Akepach P. The buffering capacity of single amino acids in brewing wort. *Int J Food Sci Technol*. 2023;58:1611–20. doi:10.1111/ijfs.15924
 131. Al-Farsi M, Al-Belushi S, Al-Amri A, Al-Hadhrami A, Al-Rusheidi M, Al-Alawi A. Quality evaluation of Omani honey. *Food Chem*. 2018;262:162–7. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.104
 132. Nanda V, Sarkar BC, Sharma HK, Bawa AS. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *J Food Compos Anal*. 2003;16:613–9. doi:10.1016/S0889-1575(03)00062-0
 133. Bely M, Rinaldi A, Dubourdieu D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J Biosci Bioeng*. 2003;96:507–12. doi:10.1016/S1389-1723(04)70141-3
 134. Mercanti N, Macaluso M, Pieracci Y, Flamini G, Scappaticci G, Marianelli A, et al. Towards Sulphite-Free Winemaking: A New Horizon of Vinification and Maturation. *Foods*. 2024;13:1108. doi:10.3390/foods13071108
 135. Iglesias A, Pascoal A, Choupina A, Carvalho C, Feás X, Estevinho L. Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. *Molecules*. 2014;19:12577–90. doi:10.3390/molecules190812577

136. Poulsen-Silva E, Gordillo-Fuenzalida F, Velásquez P, Llancahuen FM, Carvajal R, Cabaña-Brunod M, et al. Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Monofloral Honeys from Chile. *Antioxidants*. 2023;12:1785. doi:10.3390/antiox12091785
137. Pereira AP, Mendes-Ferreira A, Oliveira JM, Estevinho LM, Mendes-Faia A. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiol*. 2013;33:114–23. doi:10.1016/j.fm.2012.09.006
138. Filannino P, Di Cagno R, Gobbetti M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;49:64–72. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.016
139. Dias R, Pérez-Gregorio R. Phenolic Compounds in Wine. *Beverages*. 2023;9:70. doi:10.3390/beverages9030070
140. Zhang H, Yu D, Sun J, Liu X, Jiang L, Guo H, et al. Interaction of plant phenols with food macronutrients: characterisation and nutritional–physiological consequences. *Nutr Res Rev*. 2014;27:1–15. doi:10.1017/S095442241300019X