



# Otimização da produção de vinagre de mel

**Andreia Ferreira Pereira**

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

Orientado por

**Professor Doutor Altino Branco Choupina**

**Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho**

**Bragança  
2014**



## **Agradecimentos**

É com grande satisfação e orgulho que agradeço a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Altino Branco Choupina pela disponibilidade, simpatia, incentivo, apoio e ajuda na orientação deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho o meu sincero agradecimento pela coorientação, pela sua amizade, simpatia, dedicação, disponibilidade, incentivo, ajuda e conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho.

Ao Eng.º Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor João Verdial Andrade e a todos os funcionários e alunos da estufa, pela disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia, D<sup>a</sup> Arminda, D<sup>a</sup> Fátima, Ana Paula, Vanessa, Georgina, Ananias, Aline e Adriane, pela disponibilidade, pela amizade, pelo apoio e ajuda indispensável na realização da parte experimental deste trabalho.

Aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigado pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de Mestrado, especialmente Cristina, Gisela, Sílvia, Eduardo e Pedro, por todo o apoio e ajuda que demonstraram ao longo da realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, eles sabem quem são, que sempre acreditaram em mim, dando-me força e incentivo na conclusão deste trabalho.

A todas as minhas estrelinhas, que mesmo já tendo partido, são muito importantes para mim e me guiaram no meu percurso, dando-me força e incentivo nas horas mais difíceis.

Ao meu namorado, Victor, que sempre me apoiou em tudo e que sempre acreditou em mim, nunca me deixando desistir, pela sua ajuda, paciência, amizade, incentivo e apoio incondicional demonstrado ao longo da realização deste trabalho.

Por fim, mas os mais importantes, agradeço a toda a minha família. Ao meu Pai por todo o esforço que fez para eu conseguir atingir os meus objetivos, pela sua dedicação, compreensão e amor incondicional. A minha Mãe, que mesmo já não estando aqui presente, sempre me apoiou e me deu forças para continuar. Muito Obrigada aos dois, são um exemplo para mim. A minha irmã e cunhado pelo carinho, amizade, apoio e compreensão nos momentos difíceis. Ao meu afilhado, Martim, pelos sorrisos e bons momentos que me proporcionou.

A todos que, de qualquer forma, me ajudaram e incentivaram neste percurso e que não se encontram aqui mencionados, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Índice de Figuras</b> .....	ix
<b>Índice de Tabelas</b> .....	x
<b>Abreviaturas</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO 1: Introdução</b> .....	1
<b>Introdução geral:</b> .....	2
Objetivo geral: .....	2
Objetivos específicos:.....	2
<b>1 Revisão bibliográfica</b> .....	3
1.1 Mel.....	3
1.1.1 Composição e propriedades físico-químicas .....	3
1.1.1.1 Hidratos de carbono .....	4
1.1.1.2 Água .....	5
1.1.1.3 Ácidos orgânicos .....	5
1.1.1.4 Minerais .....	6
1.1.1.5 Cinzas .....	6
1.1.1.6 Compostos azotados .....	6
1.1.1.7 Compostos voláteis.....	7
1.1.1.8 Cor .....	7
1.1.1.9 Condutividade elétrica.....	8
1.1.1.10 Outros compostos .....	8
1.1.1.11 Espectro polínico.....	8
1.1.1.12 Microbiota do mel .....	8
1.2 Hidromel.....	9
1.2.1 Condições da fermentação.....	10
1.2.2 Problemas associados ao processo de produção de hidromel.....	11
1.3 Vinagre de mel.....	13
1.3.1 Processos de produção de vinagre .....	14
1.3.1.1 Processo de Orleans.....	15

1.3.1.2 Processo Alemão .....	16
1.3.1.3 Processo Submerso .....	17
<b>CAPÍTULO 2: Material e Métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>2 Material e Métodos.....</b>	<b>20</b>
2.1 Produção de hidromel.....	20
2.1.1 Análise polínica .....	20
2.1.2 Determinação do teor em açúcares redutores .....	21
2.1.3 Preparação do mosto-mel .....	22
2.1.4 Hidratação da levedura .....	22
2.1.5 Condições e monitorização da fermentação alcoólica.....	22
2.1.6 Caracterização físico-química do mosto-mel e hidromel .....	24
2.1.6.1 °Brix.....	24
2.1.6.2 pH .....	24
2.1.6.3 Azoto assimilável .....	24
2.1.6.4 Acidez total.....	25
2.1.6.5 Açúcares redutores .....	25
2.1.6.6 Teor alcoólico .....	25
2.1.6.7 Acidez volátil.....	26
2.1.6.8 Sulfuroso total .....	27
2.1.7 Quantificação de glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC .....	27
2.1.8 Rendimento da fermentação .....	28
2.2 Produção de Vinagre de Mel .....	28
2.2.1 Isolamento e crescimento das bactérias acéticas .....	28
2.2.2 Monitorização da fermentação acética .....	29
2.2.3 Caracterização físico-química do vinagre .....	29
2.2.3.1 pH .....	29
2.2.3.2 Quantificação do ácido acético e etanol final por HPLC .....	30
2.3 Determinação de compostos fenólicos totais .....	30
2.3.1 Preparação da solução de mel, hidromel e vinagre de mel.....	30
2.3.2 Análise de compostos fenólicos totais.....	30
2.4 Determinação de flavonoides totais.....	31

2.4.1	Análise de flavonoides totais.....	31
2.5	Tratamento dos resultados.....	33
<b>CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão.....</b>		<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Otimização da produção de vinagre de mel.....</b>	<b>36</b>
3.1	Análises ao mel.....	36
3.1.1	Análise polínica.....	36
3.1.2	Açúcares redutores.....	37
3.2	Produção de hidromel utilizando mel de urze e de eucalipto e as leveduras LSA ICV D47 e QA23.....	37
3.2.1	Performance das diferentes fermentações alcoólicas.....	37
3.2.2	Caracterização físico-química do produto final.....	41
3.2.3	Resultados do HPLC e rendimento da fermentação.....	46
3.3	Produção de vinagre de mel a partir dos diferentes hidroméis produzidos.....	50
3.3.1	Caracterização físico-química do produto final.....	50
3.4	Determinação de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais.....	52
<b>CAPÍTULO 4: Conclusões Finais.....</b>		<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Conclusões finais.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 5: Referências Bibliográficas.....</b>		<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 6: Anexos.....</b>		<b>69</b>



## Resumo

O vinagre de mel é um produto obtido por dupla fermentação, fermentação alcoólica e acética. A partir da fermentação alcoólica do mel obtém-se o hidromel, que é uma bebida alcoólica que contém entre 9-18% (v/v) de etanol. O vinagre de mel é obtido pela fermentação acética do hidromel. O presente trabalho teve como objetivo estudar a otimização da produção de vinagre de mel, utilizando dois tipos de mel, claro (eucalipto) e escuro (urze), e duas estirpes de leveduras, LSA ICV D47 e LSA QA23. Foi avaliado o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nos diversos produtos, mel, hidromel e vinagre de mel. Foi também efetuado um estudo preliminar sobre o efeito de várias colas na clarificação do hidromel.

As fermentações alcoólicas foram monitorizadas diariamente através da leitura da densidade ótica, viabilidade das células e consumo dos açúcares redutores. A qualidade do hidromel, no fim das fermentações, foi avaliada através da determinação de vários parâmetros enológicos, como o SO<sub>2</sub>, azoto assimilável, acidez total, teor alcoólico, acidez volátil, pH e açúcares redutores. Foram ainda avaliados os produtos resultantes do metabolismo (etanol, glicerol e ácido acético) por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com um detetor de índice refrativo RI-4.

Os resultados obtidos indicam que o mel escuro foi mais adequado para a produção de hidromel. Quando comparadas as duas estirpes de leveduras, apesar das diferenças na sua “performance” fermentativa não serem relevantes, a estirpe LSA QA23 foi mais adequada para a produção de hidromel. O rendimento em etanol das fermentações alcoólicas variou entre 48,37 e 53,33%.

Na produção de vinagre de mel foram utilizadas culturas puras de bactérias acéticas isoladas de vinhos tintos. As fermentações acéticas foram monitorizadas diariamente através da quantificação do consumo de etanol e da produção de ácido acético. A produção deste composto não correu como o esperado, uma vez que em ambos os hidroméis, só obtivemos um teor de ácido acético de 2g/L. A utilização de culturas puras de bactérias acéticas, a não adição de hidromel ao longo do tempo e o arejamento insuficiente poderão justificar esta situação.

**Palavras-chave:** ácido acético, etanol, hidromel, mel, vinagre de mel

## **Abstract**

The honey vinegar is a product obtained by double fermented, alcoholic and acetic fermentation. From the alcoholic fermentation of honey obtained mead, which is an alcohol that contains from 9-18% (v / v) ethanol. The honey vinegar is obtained by acetic fermentation of mead. The present work aimed to study the optimization of the production of honey vinegar, using two types of honey, of course (eucalyptus) and dark (Heather), and two yeast strains, D47 and ICV LSA LSA QA23. The content of phenolic compounds and total flavonoids in different products, honey, mead and honey vinegar was evaluated. Was also conducted a preliminary study on the effect of various glues in mead.

The fermentations were monitored daily by reading the optical density, cell viability and consumption of the reducing sugars. The quality of mead at the end of fermentation, was evaluated by determining various enological parameters such as SO<sub>2</sub>, assimilable nitrogen, total acidity, alcohol, volatile acidity, pH and reducing sugars. We also assessed the products of metabolism (ethanol, glycerol and acetic acid) by High-performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector RI-4.

The results indicate that the dark honey was more adapt for the production of mead. When comparing the two yeast strains, despite the differences in its "performance" are not relevant fermentation, the LSA QA23 strain was more adapt for the production of mead. The ethanol yield from fermentations ranged between 48.37 and 53.33%.

In the production of honey vinegar pure cultures of acetic bacteria isolated from red wines were used. The aseptic fermentations were monitored daily by measuring the consumption of ethanol and acetic acid production. The production of this compound did not go as expected, since in both meads only obtained an acetic acid concentration of 2g/L. The use of pure cultures of acetic bacteria, not to the addition of mead over time and insufficient ventilation may justify this.

**Keywords:** acetic acid, ethanol, mead, honey, honey vinegar

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da oxidação do etanol a ácido acético.....	15
<b>Figura 2:</b> Processo de Orleans para a produção de vinagre (Fonte: adaptado de Aquarone <i>et al.</i> , 2001).....	16
<b>Figura 3:</b> Gerador para a produção de vinagre utilizado no processo Alemão (Fonte: adaptado de Aquarone <i>et al.</i> , 2001).....	17
<b>Figura 4:</b> Corte transversal de um acetificador para a elaboração de vinagre pelo método com fermentação acética (Fonte: Mecca <i>et al.</i> , 1979).....	18
<b>Figura 5:</b> Determinação da acidez total.....	25
<b>Figura 6:</b> Ebuliómetro.....	26
<b>Figura 7:</b> Aparelho Cazenave-Ferré.....	27
<b>Figura 8:</b> Crescimento de bactérias acéticas em meio sólido.....	29
<b>Figura 9:</b> Determinação dos compostos fenólicos totais.....	30
<b>Figura 10:</b> Reta de calibração para os compostos fenólicos totais.....	31
<b>Figura 11:</b> Determinação de flavonoides totais.....	32
<b>Figura 12:</b> Reta de calibração para os flavonoides totais.....	33
<b>Figura 13:</b> Caracterização das amostras de mel em estudo.....	36
<b>Figura 14:</b> Variação da viabilidade das células <i>S. cerevisiae</i> em função do tempo.....	39
<b>Figura 15:</b> Variação dos açúcares redutores ao longo do tempo.....	41
<b>Figura 16:</b> Determinação da glucose e frutose por HPLC no mosto-mel de urze com a LSA QA23.....	47

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Análise dos açúcares redutores do mel.....	37
<b>Tabela 2:</b> Análises físico-químicas do mosto-mel de Urze e Eucalipto.....	38
<b>Tabela 3:</b> Taxa específica de crescimento e biomassa final do hidromel.....	40
<b>Tabela 4:</b> Análises físico-químicas do hidromel ..... <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Tabela 5:</b> Resultados do HPLC e rendimento das fermentações.....	49
<b>Tabela 6:</b> Análises físico-químicas do vinagre de mel... <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
<b>Tabela 7:</b> Resultados dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais do mel, hidromel e vinagre de mel.....	52

## Abreviaturas

% - Percentagem

% (v/v) – Percentagem em volume/volume

°C – Graus Celcius

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

XVIII - 18

AG – Ácido gálico

ANOVA – Análise de variâncias

CaSO<sub>4</sub> – Sulfato de cálcio

cm<sup>3</sup> – centímetros cúbicos

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

g – Grama

g/g – Grama por grama

g/hL – Grama por hectolitro

g/L – Grama por litro

g/mL – Grama por mililitro

GYC – Glucose Yeast CaCO<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>O – Água

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio

Kg - Quilograma

L - Litro

LSA ICV D47 – Levedura seca ativa ICV D47

LSA QA23 – Levedura seca ativa QA23

mg – Miligrama

mg/kg – Miligrama por quilograma

mg/L – Miligrama por litro

**mg/mL** – Miligrama por mililitro  
**mL** – Mililitro  
**mL/L** – Mililitro por litro  
**mL/min** – Mililitro por minuto  
**mm** – Milímetros  
**mS/cm** – MiliSiemens por centímetro  
**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio  
**MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** – Sulfato de magnésio heptahidratado  
**N** - Normalidade  
**NADP** – Nicotinamida-adenina-dinucleotídio-fosfato  
**NaHSO<sub>4</sub>** – Bissulfato de sódio  
**NaOH** – Hidróxido de sódio  
**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – Fosfato de diamónio  
**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Sulfato de amónio  
**(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** – Fosfato de amónio  
**NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Diidrogenofosfato de amónio  
**nm** – Nanómetros  
**OIV** – Organização Internacional da Vinha e do Vinho  
**pH** – Potencial de hidrogénio  
**Q** – Quercetina  
**rpm** – Rotações por minuto  
**SO<sub>2</sub>** – Dióxido de enxofre  
**UFC`s** – Unidade formadora de colónias  
**UFC`s/mL** – Unidade formadora de colónias por mililitro  
**UV** – Ultra violeta  
**YPD** – Yeast Peptone Dextrose  
**µL** - Microlitro

# CAPÍTULO 1:

## *Introdução*

## **Introdução geral:**

Estima-se que a produção mundial de mel seja superior a 1.200.000 toneladas por ano, sendo a Europa o maior consumidor, produtor e importador de mel do mundo. Nos últimos 20 anos verificou-se um aumento crescente na produção devido ao acréscimo no número de colmeias e da produção por colónia. O consumo de mel também cresceu, devido à melhoria dos padrões de vida e a um interesse por produtos naturais e saudáveis.

A produção de mel em Portugal engloba milhares de produtores, assumindo-se como uma atividade económica muito importante a nível nacional e, principalmente, regional. Consoante a sua origem geográfica, o mel apresenta características específicas.

Contudo, convém salientar que nem todo o mel produzido é de elevada qualidade, pelo que, de forma a aumentar o rendimento dos apicultores é necessário transformar esse mel de segunda categoria em produtos de valor acrescentado, como o hidromel e o vinagre de mel.

Tendo em conta que em Portugal o hidromel ainda é produzido de forma empírica e artesanal e que a tecnologia de produção do vinagre de mel carece de suporte técnico-científico, é oportuno realizar estudos com vista à otimização destes processos, de forma a aumentar o rendimento e qualidade dos produtos.

## **Objetivo geral:**

Otimização da produção de vinagre de mel a partir de mel de segunda categoria, utilizando duas estirpes de leveduras.

## **Objetivos específicos:**

- Avaliar a possibilidade de utilizar mel de segunda categoria na produção de hidromel.
- Otimizar a produção de vinagre de mel a partir dos diferentes tipos de hidromel produzidos.

# 1 Revisão bibliográfica

## 1.1 Mel

De acordo com o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, entende-se por mel a “*substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie Apis melífera a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia*”.

Segundo o referido Decreto-Lei os principais tipos de mel podem ser agrupados consoante a origem e modo de produção e ou de apresentação. De acordo com a origem o mel pode ser classificado em mel de néctar ou mel de flores, “*mel obtido a partir do néctar das plantas*”, e em mel de melada, “*mel obtido principalmente a partir de excreções de insetos sugadores de plantas (hemíptera) que ficam sobre as partes vivas das plantas ou de secreções provenientes de partes vivas das planta*”. Em relação ao modo de produção e ou de apresentação pode ser classificado em mel em favos, mel em pedaços de favos, mel escorrido, mel centrifugado, mel prensado e mel filtrado.

O mel em função da fonte de néctar, pode ser classificado em monofloral ou multifloral, dependendo se o néctar é recolhido de uma única espécie botânica ou de mais de uma espécie botânica, respetivamente (Vargas, 2006).

Este produto natural é a maior fonte concentrada de açúcares existentes (FAO, 1996) sendo por isso utilizado como conservante alimentar (Ferreira *et al.*, 2009). É também uma excelente opção nutricional devido aos seus benefícios para a saúde, como efeito bactericida, antisséptico, antirreumático, diurético, digestivo, prevenção de constipações e gripes, entre outros (Cuevas-Glory *et al.*, 2007).

### 1.1.1 Composição e propriedades físico-químicas

A composição físico-química do mel é muito variável, uma vez que, depende de vários fatores, como origem floral, clima, condições ambientais e sazonais, manuseamento e processamento (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azeredo *et al.*, 2003; Arráez-Román *et al.*, 2006; Baltrusaityte *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

A sua composição é muito complexa, tendo sido já identificados até ao momento cerca de 200 compostos (Al-Mamary *et al.*, 2002; Arráez-Román *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009), sendo a maioria hidratos de carbono, como a frutose e glucose. Apresenta ainda outras substâncias em pequenas quantidades, sais minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), enzimas e outras substâncias fitoquímicas (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

A qualidade do mel depende das suas propriedades sensoriais, físicas e químicas. Estas são influenciadas pela fonte de néctar e pólen, cor, aroma, humidade, teor em proteínas e açúcares (Finola *et al.*, 2007). A avaliação destas propriedades é efetuada com base nos parâmetros estabelecidos pelo Codex Alimentarius (Codex Alimentarius – International Food Standards, 1981) e pelo Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro. Segundo esta legislação devem também ser analisados, os teores de açúcares redutores e de hidroximetilfurfural (HMF), bem como os teores de sacarose, água, matérias insolúveis na água, cinzas, minerais, condutividade elétrica, acidez e índice diastásico.

#### **1.1.1.1 Hidratos de carbono**

Os hidratos de carbono constituem os principais componentes do mel, representando cerca de 95 a 99% da matéria seca (Olaitan *et al.*, 2007), sendo os açúcares redutores frutose (38,4%) e glucose (30,3%) os maioritários (Iurlina e Fritz, 2005). A proporção de frutose e glucose é de grande importância, pois afeta o sabor e a cristalização do mel. Como a glucose é pouco solúvel em água um conteúdo elevado deste açúcar conduz à cristalização do mel (Anklam, 1998; Rodriguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007).

A presença de mais de 5% de sacarose aparente no mel pode simbolizar uma recolha prematura (Küçük *et al.*, 2007) ou apontar para uma adulteração do produto (Sodré *et al.*, 2007).

De acordo com a Legislação Portuguesa, o mel deve apresentar um teor mínimo de 60g/100g de açúcares redutores, glucose e frutose, para o mel de néctar e de 45g/100g de açúcares redutores para o mel de melada e misturas de mel de melada com mel de néctar.

Os açúcares redutores do mel são responsáveis por alguma das suas propriedades, tais como viscosidade, higroscopicidade, granulação, valor energético e atividade antimicrobiana (Iurlina e Fritz, 2005; Küçük *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.2 Água**

A atividade da água do mel varia entre 0,5 e 0,6, sendo o segundo componente maioritário no mel (Iurlina e Fritz, 2005).

O teor de água presente no mel pode ser influenciado por vários fatores como por exemplo, a época de colheita, o grau de maturação da colmeia, as condições climáticas e pela manipulação do mel durante a extração e armazenamento (Finola *et al.*, 2007).

Segundo a Legislação Portuguesa o limite máximo de água no mel é de 20%. Méis com teores elevados de água podem apresentar dificuldades de preservação e armazenamento, devido à ocorrência de fermentações indesejáveis (Olaitan *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007). O conteúdo de água é um fator importante, uma vez que pode influenciar a viscosidade, peso, maturidade, cristalização, conservação, sabor e palatabilidade do mel (Mendes *et al.*, 2009).

#### **1.1.1.3 Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos influenciam a acidez do mel, contribuindo para o seu sabor característico (Anklam, 1998). Representam 0,57% dos constituintes do mel, sendo o mais abundante o ácido glucónico, um produto resultante da digestão enzimática da glucose (Olaitan *et al.*, 2007). Encontram-se ainda presentes outros ácidos, como por exemplo o pirúvico, málico, cítrico, sucínico e fumárico (Anklam, 1998).

O tipo floral e a época da colheita são dos principais fatores que influenciam a acidez do mel (Küçük *et al.*, 2007; de Rodríguez *et al.*, 2004). De facto, os méis multiflorais apresentam valores de acidez inferiores (Küçük *et al.*, 2007). Segundo Finola *et al.*, (2007), existe uma relação inversa entre a acidez livre e o teor em cinzas do mel, isto porque o teor de minerais mais elevados corresponde a uma maior fração de ácidos salinizados.

O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1, com um valor médio de 3,9 (Iurlina e Fritz, 2005), no entanto, este parâmetro não se encontra diretamente relacionado com a acidez

livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (de Rodríguez *et al.*, 2004).

#### **1.1.1.4 Minerais**

A quantidade de minerais no mel depende de vários fatores, principalmente, do tipo de solo em que a planta produtora de pólen se encontra e da cor do mel. Em relação à cor, quanto mais rico em minerais mais escuro será o mel. O teor de minerais varia entre 0,04% nos méis claros e 0,2% em méis escuros (Anklam, 1998). O conteúdo em minerais do mel pode fornecer informações acerca da poluição ambiental e da sua origem geográfica (Anklam, 1998).

#### **1.1.1.5 Cinzas**

O teor em cinzas está diretamente relacionado com o teor em minerais. De facto, se entre amostras de mel se verificar uma dispersão elevada do teor em cinzas pode inferir-se que o processo de recolha ou as técnicas utilizadas pelos produtores não foram uniformes (Finola *et al.*, 2007).

De acordo com a literatura, os méis de cor clara apresentam geralmente um teor em cinzas inferior ao obtido nos de cor escura (Finola *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.6 Compostos azotados**

O teor de proteínas do mel é, aproximadamente 0,2% (Anklam, 1998; Iurlina e Fritz, 2005), sendo estes provenientes das abelhas e das plantas. Uma pequena fração destes compostos são enzimas, tais como a invertase, diastase, amilase, glucose oxidase, catalase (Anklam, 1998),  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase e amilase (Won *et al.*, 2008).

O valor médio de azoto no mel é de 0,04% (Anklam, 1998), sendo esses compostos essencialmente alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas (Al-Mamary *et al.*, 2002). Em relação aos aminoácidos, a prolina é dominante mas também já foram identificados arginina, triptofano e cisteína (Anklam, 1998). O perfil de aminoácidos é considerado o parâmetro mais adequado para identificação da origem botânica e geográfica do mel (Anklam, 1998).

O índice diastásico e o teor em HMF são parâmetros indicadores da frescura do mel (Valbuena, 1992; de Rodríguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007). O índice diastásico diminui com o tempo de armazenamento e com o aumento da temperatura (Vargas, 2006; Fallico *et al.*, 2006), sendo a sua determinação utilizada para avaliar o sobreaquecimento durante o processamento do mel (Vargas, 2006) e detetar adulterações do produto (Aroucha *et al.*, 2008). O HMF é um composto formado pela degradação dos açúcares, reduzindo conseqüentemente o valor nutritivo do mel. Para além disso, a sua presença influencia a cor, sabor e odor, sendo portanto utilizado como um parâmetro da qualidade (Valbuena, 1992). Concentrações elevadas de HMF no mel são indicadoras de sobreaquecimento, armazenamento prolongado e adulterações do produto (Vargas, 2006). Os limites estabelecidos para estes dois parâmetros são mínimo de 8 para o índice diastático e máximo de 40 mg/kg para o HMF, pelo que méis de elevada qualidade deverão apresentar um índice diastático elevado e um teor de HMF baixo (Küçük *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.7 Compostos voláteis**

Os compostos voláteis, maioritariamente provenientes do néctar das flores, são responsáveis por conferir o *flavour* característico de cada mel (Radovic *et al.*, 2001; Bonvehí e Coll, 2003; Finola *et al.*, 2007;). Neste produto já foram identificados mais de 300 voláteis, incluindo ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres (Castro-Vásquez *et al.*, 2009). Estes compostos são indicadores da origem botânica, isto é, se o mel foi produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou se teve origem em secreções das plantas ou insetos (Escriche *et al.*, 2009).

Segundo Castro-Vásquez *et al.*, (2006), os compostos voláteis, derivados de furano, são bons indicadores do tratamento térmico e das condições de armazenamento.

#### **1.1.1.8 Cor**

A cor do mel esta relacionada com o seu conteúdo em minerais e compostos fenólicos e é característica da origem botânica (Bertoncelj *et al.*, 2007; Baltrusaityte *et al.*, 2007; Finola *et al.*, 2007). A idade e as condições de armazenamento também influenciam este parâmetro, já as partículas suspensas influenciam a transparência ou

claridade (Olaitan *et al.*, 2007). A cor do mel pode variar de amarelo pálido a âmbar, e de âmbar vermelho escuro até quase preto (Bertoncelj *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.9 Condutividade elétrica**

A condutividade elétrica do mel está diretamente relacionada com o teor de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas. É geralmente, utilizada para selecionar méis de origens florais distintas (Acquarone *et al.*, 2007). A legislação estabelece o valor máximo para este parâmetro de 0,8 mS/cm.

#### **1.1.1.10 Outros compostos**

As vitaminas C, B (tiamina) e do complexo B2, como a riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantoténico estão presentes no mel, em pequenas quantidades (Olaitan *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.11 Espetro polínico**

A análise polínica do mel tem como objetivo a identificação da origem botânica e/ou geográfica, pois este nunca apresenta apenas uma fonte floral. No entanto, pode ser produzido maioritariamente a partir de uma única espécie de planta, sendo assim designado por mel monofloral (Anklam, 1998). No entanto, dependendo do tipo de mel existem algumas exceções, como é o caso do mel de castanheiro que necessita de possuir pelo menos 90% de pólen de *Castanea sp.* (Anklam, 1998) e o mel de lavandula que só necessita de apresentar 15% de pólen da espécie *Lavandula sp.* (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia *et al.*, 2003).

#### **1.1.1.12 Microbiota do mel**

A qualidade do mel não é só influenciada pelas propriedades físico-químicas mas também pela microbiota do mel, ou seja, os microrganismos presentes no mel. A microbiota do mel é afectada pelo tipo de mel e pelo seu teor em água, uma vez que o baixo teor em água inibe o crescimento microbiano. Os fungos são mais tolerantes ao elevado efeito osmótico que as bactérias (Olaitan *et al.*, 2007). As substâncias com ação bacteriostática ou bactericida, o pH baixo e o elevado teor de açúcares do mel vão afetar

o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, prevenindo deste modo o seu aparecimento (Iurlina e Fritz, 2005). Naturalmente, é de esperar que o mel contenha um pequeno número e uma variedade limitada de microrganismos.

## 1.2 Hidromel

O hidromel é, provavelmente, a bebida alcoólica mais antiga da humanidade, sendo produzida mesmo antes do vinho. Antigamente o seu uso era generalizado, porém verificou-se um declínio devido principalmente a dois fatores. O primeiro fator foi a descoberta da fermentação da uva, mais fácil e barata, tomando assim o vinho o lugar do hidromel nas regiões onde a uva podia ser facilmente cultivada. O segundo foi a urbanização, com a introdução da cana como um meio mais barato de obter açúcar caiu drasticamente a produção de mel, aumentando conseqüentemente o seu preço. No norte da Europa, região pouco propícia à produção de vinho, o consumo de hidromel foi bastante popular até o vinho ter sido importado a baixo custo de regiões do sul. Hoje em dia, ainda é produzido hidromel em alguns países, como é o caso da Inglaterra, Polónia, Alemanha, Eslovénia e em países africanos, como a Etiópia e África do Sul. No entanto, devido à falta de progresso científico nesta área em alguns desses países, tem havido uma queda na produção. Segundo Sroka e Tuszynski (2007) alguns dos problemas associados ao decréscimo da produção estão relacionados com o tempo de fermentação do mosto mel e maturação do hidromel, que pode ir de alguns meses até anos e ao preço das matérias-primas, o que faz com que o preço do produto final seja muito elevado.

Em Portugal, a produção de hidromel é feita de forma artesanal por um número muito reduzido de apicultores.

O hidromel é uma bebida alcoólica, que contém entre 9% a 18% (v/v) de etanol, obtida pela fermentação alcoólica do mosto mel (mel diluído em água ou em sumo de frutas) por leveduras (Sroka e Tuszynski, 2007). As leveduras utilizadas na produção de hidromel são normalmente estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, usadas na produção de vinho, cerveja e champanhe. Atualmente, existem diversas estirpes de leveduras enológicas, cujos compostos sintetizados podem variar bastante entre estirpes (Schuller e Casal, 2005). No entanto, a maioria destas leveduras não estão adaptadas às condições existentes no mosto mel, nomeadamente, teores elevados de açúcares, valores de pH baixos e concentrações reduzidas de azoto.

Segundo a tecnologia de fabrico, o hidromel pode ser classificado em seco, licoroso, doce e espumoso. Esta classificação depende do tempo de fermentação, da quantidade de mel utilizada e do teor alcoólico, resultante da adição de aguardente vínica (Navrátil *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Condições da fermentação

A produção de hidromel segue várias etapas, consistindo a primeira na diluição do mel em água ou sumo de frutas, seguida da adição de uma mistura de nutrientes a essa solução. Essa mistura pode conter:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHSO}_4$ , ácido cítrico, citrato de sódio, ácido tartárico, tartarato de potássio, tartarato de sódio e de potássio, ácido málico, vitaminas, mio-inositol e peptona (McConnell e Schramm, 1995; Navrátil *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2009; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). Segundo Roldán *et al.*, (2011), a adição de pólen ao mosto melhora a “performance” fermentativa, a produção de etanol e os atributos sensoriais do hidromel.

A etapa seguinte consiste no ajuste do pH para valores de 3,7 a 4,0. Este ajuste é feito mediante a adição de um tampão (McConnell e Schramm, 1995), como o carbonato de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio e ácido tartárico. Porém a adição destes sais pode levar ao aparecimento de sabores amargo e salgado (McConnell e Schramm, 1995).

A terceira etapa consiste na pasteurização do mosto (McConnell e Schramm, 1995; Navrátil *et al.*, 2001; Ukpabi, 2006; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010), com o objetivo de reduzir a microbiota presente no mosto mel (Wintersteen *et al.*, 2005). Existem outras técnicas para reduzir a carga microbiana que são menos agressivas para o mosto, tais como a utilização de meta bissulfito, que consta da adição de sais de sódio ou potássio que libertam dióxido de enxofre que vai eliminar ou inibir a maioria dos microrganismos (McConnell e Schramm, 1995; Roldán *et al.*, 2011), a ultrafiltração (McConnell e Schramm, 1995) e o gás de dióxido de enxofre (Pereira *et al.*, 2009; Ukpabi, 2006). O inconveniente de alguns destes métodos é que removem as proteínas por desnaturação e coagulação.

No passo seguinte procedesse à hidratação da levedura selecionada para a produção de hidromel e, posteriormente, inoculasse no mosto mel e incuba-se a uma

temperatura apropriada (Pereira *et al.*, 2013). Não há consenso entre os investigadores relativamente à temperatura a que deve ser conduzida a fermentação do mosto mel. De acordo com McConnell e Schramm (1995) deve ser levada a cabo à temperatura ambiente, Navrátil *et al.* (2001) realizou ensaios utilizando temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, Ukpabi (2006) recomenda temperaturas de 25 e 26°C, Pereira *et al.* (2009) utilizou uma temperatura de 27°C e Mendes-Ferreira *et al.* (2010) de 22°C. Após a execução dos passos anteriormente referidos, a monitorização e desempenho fermentativo é realizado diariamente retirando uma pequena quantidade de amostra que é posteriormente analisada (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014). No final da fermentação é realizada uma filtração/centrifugação para obtenção do hidromel final sem impurezas (Ramalhosa *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Problemas associados ao processo de produção de hidromel**

Existem vários problemas associados ao processo de produção de hidromel, nomeadamente, “amuos” e atrasos na fermentação, aumento da acidez volátil, contaminação por bactérias e refermentação por leveduras. Todos estes fatores poderão contribuir para a falta de uniformidade do produto final (Sroka e Tuszynski, 2007; Pereira *et al.*, 2009).

Estes problemas estão normalmente associados com a incapacidade das estirpes de leveduras para se adaptarem às condições de crescimento desfavoráveis, como por exemplo limitação em nutrientes, stresse osmótico, excesso de etanol e tensões por choque térmico (Attfield, 1997; Bauer e Pretorius, 2000; Bisson, 1999).

Foram já realizados alguns estudos de forma a ultrapassar esta situação e melhorar a qualidade do produto final. Sroka e Tuszynski (2007), estudou a influência do conteúdo em ácidos orgânicos na fermentação do mosto mel. Verificaram que o mel continha quantidades relativamente elevadas de ácidos gordos de cadeia média, na sua maioria ácidos decanóico (42 mg/L), dodecanóico (31 mg/L) e octanóico (26 mg/L), que se acredita inibem a fermentação. Observaram também a formação de ácido acético e sucínico durante os primeiros dias de fermentação e a diminuição do teor de ácidos gordos em 70 a 80%.

Também, os baixos teores de substâncias azotadas e de minerais presentes no mel, indispensáveis para a multiplicação das leveduras e o pH ácido do mosto afetam

negativamente o desenvolvimento do processo. Segundo Mendes-Ferreira *et al.* (2010) o ácido tartárico ajuda a prevenir o “amuo” da fermentação, mantendo o pH dentro dos valores permissivos ao crescimento das leveduras.

De todos os nutrientes assimilados pelas leveduras durante a fermentação, os compostos azotados são quantitativamente os mais importantes, depois dos compostos de carbono, pois são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (Casellas, 2005). Quantidades de azoto assimilável inadequadas no meio de fermentação podem levar a um crescimento deficiente, a fermentações prolongadas, a taxas de crescimento reduzidas e, conseqüentemente a uma diminuição da produtividade (Ivorra *et al.*, 1999). Convém no entanto salientar, que o teor de azoto influencia a qualidade sensorial do hidromel, pois a composição em aminoácidos afeta o metabolismo da levedura conduzindo à produção de compostos aromáticos voláteis (Roldán *et al.*, 2011).

Outro fator que também influencia a produção de hidromel é o tipo de mel. Num estudo conduzido por Pereira *et al.*, (2009), sobre a capacidade da levedura *S. cerevisiae* produzir hidromel a partir de mel da região de Trás-os-Montes, verificou que o tipo de mel e os suplementos usados afetaram a duração da fermentação e a qualidade do produto final. Estes investigadores obtiveram melhores resultados para o mel escuro do que para o mel claro, sendo isto explicado pelo facto do mel escuro ser mais rico em minerais.

A duração da fermentação ainda é um grande problema na produção de hidromel, sendo alvo de alguns estudos de modo a reduzir esse tempo, sem alterar a qualidade do produto. Pereira *et al.*, (2009), utilizando méis claros e escuros enriquecidos com dois suplementos diferentes, obtiveram fermentações completas ao fim de oito dias. Enquanto que, nos trabalhos conduzidos por Mendes-Ferreira *et al.*, (2010), a fermentação terminou ao fim de 11 dias em mostos adicionados de tartarato de potássio, ácido málico e fosfato de diamónio.

Pereira *et al.*, (2014), quando utilizou na produção de hidromel células de *S. cerevisiae* imobilizadas em camada simples de alginato de cálcio e em camada dupla de quitosano-alginato, não obteve grandes vantagens comparativamente com as células livres. O principal problema encontrado neste estudo foi a libertação das células para o mosto.

### 1.3 Vinagre de mel

Segundo o descrito no Decreto-Lei nº 174/2007 de 8 de Maio, entende-se por vinagre “o produto obtido exclusivamente pelo processo biológico da dupla fermentação, alcoólica e acética, de produtos de origem agrícola”. De acordo com o mesmo Decreto-lei, os vinagres podem classificar-se quanto à sua origem em vinagre de vinho, vinagre de bagas, vinagre de sidra, vinagre de álcool, vinagre de cereais, vinagre de malte, vinagre de malte destilado, vinagres aromatizados e vinagres com especiarias.

A palavra vinagre deriva do latim *Vinum acre*, equivalente em português a *vinho azedo*.

As primeiras referências ao vinagre datam de há cerca de 10 000 anos. Este produto é um condimento muito utilizado devido às propriedades benéficas para o organismo humano e à sua importância na alimentação. Foi muito utilizado como bebida refrescante, diluído na água e também como medicamento. Foi recomendado para tratar de disfunções respiratórias, feridas e úlceras, devido às suas propriedades desinfetantes e anti-inflamatórias. Na cozinha, a utilização do vinagre foi generalizada e constante ao longo dos tempos (Suarez-Lepe e Íñigo-Leal, 2004).

O vinagre é uma solução diluída de ácido acético, obtida através de dois processos bioquímicos sucessivos, a fermentação alcoólica, que converte açúcares em etanol, e a oxidação fermentativa, que converte o etanol em ácido acético (Bortolini *et al.*, 2001; Tesfaye *et al.*, 2002). No caso de vinagre de mel começamos com a produção de hidromel, fermentação alcoólica, passando depois para a produção de vinagre, fermentação acética.

A produção de vinagre permite a utilização de matérias-primas impróprias para o consumo dos estabelecimentos industriais de frutas (Maldonado *et al.*, 1975) e de explorações agrícolas (Evangelista, 2001), constituindo-se como uma forma de aproveitamento de excedentes das colheitas (Oliveira *et al.*, 1987; Bortolini *et al.*, 2001).

Os vinagres de frutas são considerados superiores em termos de propriedades sensoriais e nutritivas, quando comparados a outros tipos de vinagres, pois apresentam elevados teores de vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos provenientes dos frutos (Aquarone *et al.*, 2001; Zancanaro, 2001).

A qualidade do vinagre pode ser influenciada pela matéria-prima utilizada na sua elaboração, pelo sistema de acetificação, e ainda pela presença ou não de processos de envelhecimento em barris de madeira (Tesfaye *et al.*, 2002).

### **1.3.1 Processos de produção de vinagre**

O vinagre pode ser produzido por dois métodos. O primeiro consiste na fermentação ou acetificação à superfície do meio de cultura. Neste processo as bactérias acéticas encontram-se na interface líquido/gás fixas através de suportes de materiais, como por exemplo, aparas de madeira. Já o segundo é um processo submerso. As bactérias acéticas encontram-se submersas no interior do líquido, no qual se introduz ar, simples ou enriquecido com oxigénio, em condições que permitam a máxima transferência desde a fase gasosa até a fase líquida. O segundo processo é o mais utilizado atualmente, por se produzir o vinagre de uma forma rápida (Suarez-Lepe e Inigo-Leal, 2004).

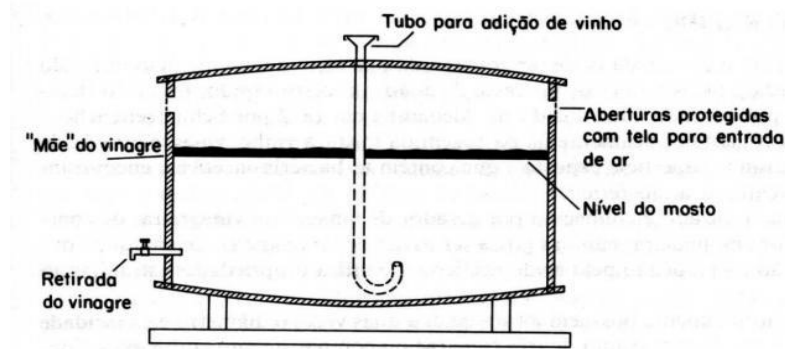
Enquanto na fermentação alcoólica é desejável a utilização de culturas puras de *S. cerevisiae* para se obter um produto final agradável, na fermentação acética o uso de culturas puras resulta num produto inferior ao obtido com culturas mistas de *Acetobacter*, pois estas bactérias atuam provavelmente em simbiose (Adams, 1997).

As bactérias acéticas diferem da maioria das outras bactérias aeróbias pelo facto de não oxidarem completamente as suas fontes de energia a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, produzindo pequenas quantidades de outros produtos, como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos. A temperatura ótima de crescimento das bactérias acéticas varia entre 25 e 30 °C, tendo um desenvolvimento adequado para valores de pH que oscilam entre 5,4 e 6,3 (ácido-tolerantes).

Durante a sua multiplicação o consumo de oxigénio é elevado, sendo o principal problema na produção de vinagre a necessidade de controlar rigorosamente o arejamento.

O processo metabólico da fermentação acética (Fig. 1) baseia-se na conversão do etanol, pela ação da enzima álcool desidrogenase, que transfere os átomos de hidrogénio do etanol para o oxigénio, em acetaldeído, que pela adição de água forma hidrato de acetaldeído. A partir do último produto, forma-se o ácido acético pela ação da acetaldeído-desidrogenase sendo a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP)





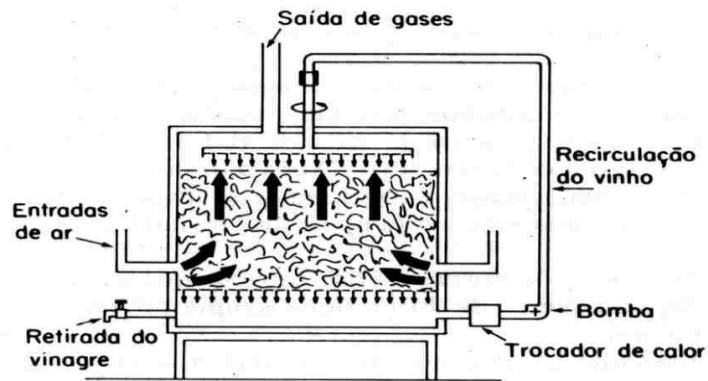
**Figura 2:** Processo de Orleans para a produção de vinagre  
(Fonte: adaptado de Aquarone *et al.*, 2001).

### 1.3.1.2 Processo Alemão

Os processos rápidos, como é o caso do Processo Alemão, são bastante utilizados atualmente. Foram idealizados por Boerhave no começo do século XVIII, ao descobrir que a transformação do vinho em vinagre era bastante rápida quando deixava passar o vinho, através de um recipiente cheio de bagaço. Atualmente, são utilizados recipientes geradores, empacotados com material de enchimento dos mais diversos tipos de materiais, como a madeira. As bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam o etanol a ácido acético (Llaguno e Polo, 1991).

O vinho circula repetidas vezes no gerador enquanto se injeta ar no sentido contrário (Figura 3). O calor não se espalha tão facilmente como no método tradicional, e é necessário, então, um método de arrefecimento, estabelecendo um gradiente de temperatura que impulsiona a circulação do ar. O vinho passa pela madeira, onde as bactérias acéticas ficam fixadas, transformando o etanol em ácido acético. Uma vez ocorrido o processo total, descarrega-se metade da tina do depósito, voltando a introduzir a mesma carga de vinho base (Aquarone *et al.*, 2001).

Neste processo obtém-se um vinagre de boa qualidade, mas com baixo rendimento.



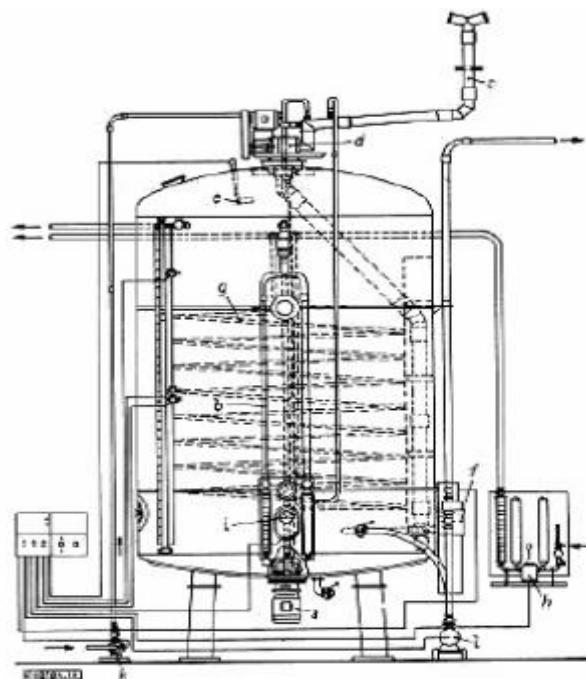
**Figura 3:** Gerador para a produção de vinagre utilizado no processo Alemão (Fonte: adaptado de Aquarone *et al.*, 2001).

### 1.3.1.3 Processo Submerso

No Processo Submerso, as bactérias acéticas encontram-se submersas no vinho, onde se multiplicam, convertendo o etanol em ácido acético (Figura 4). No entanto, para ocorrer essa reação, as bactérias acéticas necessitam da introdução contínua e adequada de oxigénio, uma vez que pequenas interrupções no seu fornecimento, principalmente nas fases finais da fermentação pode afetar o rendimento do processo (Llaguno & Polo, 1991).

Este processo é muito eficiente e rápido, pois existe um grande contato entre as bactérias acéticas, o oxigénio e o etanol presente no vinho. As perdas por evaporação são mínimas, pois o oxigénio só é administrado quando se verifica o decréscimo da pressão interna, devido ao seu consumo (Sachs, 2001).

Devido ao revolvimento acentuado e persistente, provocado pela introdução de ar sob pressão durante a acetificação, o produto final apresenta-se turvo e a qualidade é inferior ao obtido pelo processo lento (Sachs, 2001).



**Figura 4:** Corte transversal de um acetificador para elaboração de vinagre pelo método com fermentação acética submersa; a- turbina de ar; b- compensador de ar; c- dispositivo para coletar líquido de condensação; d-e- dispositivo para controlar a formação de espuma; f- dispositivo para medir o álcool; g- serpentina para refrigeração; h- dispositivo para refrigeração; i- termômetro; j- bomba para entrada do vinho; k- bomba para retirada do vinagre (Fonte: Mecca *et al.*, 1979).

# **CAPÍTULO 2:**

## ***Material e Métodos***

## **2 Material e Métodos**

Para otimizar a produção de vinagre de mel foram utilizados dois tipos de mel, mel claro (eucalipto) e mel escuro (urze), de segunda categoria, ou seja, mel obtido durante o seu processamento e considerado desperdício. Para a produção de hidromel, produto base para a produção de vinagre de mel, foram ainda utilizadas duas leveduras comerciais *S. cerevisiae* ICV D47 e a *S. cerevisiae* QA23, a fim de avaliar a que apresentava melhor desempenho fermentativo. As fermentações alcoólicas foram monitorizadas diariamente através da determinação da biomassa celular, viabilidade celular e açúcares redutores. Na produção de vinagre de mel foram utilizadas culturas puras de bactérias acéticas isoladas de vinhos tintos que, posteriormente, foram adicionadas aos diferentes tipos de hidromel a produzir. As fermentações acéticas foram monitorizadas diariamente através da quantificação do consumo de etanol e da produção de ácido acético.

### **2.1 Produção de hidromel**

Para avaliar qual o tipo de mel e qual a levedura que apresenta melhor desempenho na produção de hidromel foram efetuados 4 ensaios cada um deles em triplicado (repetições independentes).

Para calcular a quantidade de mel a adicionar para preparar o mosto mel determinou-se o seu teor em açúcares redutores.

Para caracterizar o mosto-mel foram determinados os seguintes parâmetros: °Brix, pH, azoto assimilável, acidez total e açúcares redutores. No produto final determinou-se o teor alcoólico, pH, acidez total, acidez volátil, sulfuroso total, azoto assimilável e açúcares redutores.

#### **2.1.1 Análise polínica**

A origem botânica das amostras de mel foi determinada pelo método proposto por Louveaux *et al.*, (1978), que se baseia na análise do espectro polínico.

A análise foi efetuada pelo método da preparação de lâminas sem acetólise. Para tal, pesaram-se 10 g de mel e dissolveram-se em 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (água

acidificada), colocando-a em banho-maria a 40°C para se dissolver completamente. Em seguida, distribuiu-se por 2 tubos de centrífuga, aproximadamente, 10 mL da solução anterior e acrescentou-se 5 mL de água, levando-os a centrifugar durante 10 minutos a 2600 rpm. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 10mL de água destilada e agitado cuidadosamente para remover completamente os açúcares do mel e dispersar novamente o sedimento. Verteu-se a solução para novos tubos, centrifugou-se e desprezou-se o sobrenadante. A preparação das lâminas foi efetuada com uma gota do sedimento e uma gota de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. O exame das lâminas, contendo os grãos de pólen, foi realizada num microscópio ótico, a fim de fazer a identificação e quantificação de todos os tipos de pólen. Como referência, foi utilizada uma coleção de pólenes da Escola Superior Agrária de Bragança.

### **2.1.2 Determinação do teor em açúcares redutores**

O teor em açúcares redutores dos méis foi determinado pelo método descrito por Bogdanov *et al.*, (1997).

O método consiste na redução da solução de Fehling modificada (Soxhelt), titulando-a em ebulição com uma solução de açúcares redutores contidos no mel, utilizando o azul-de-metileno como indicador. Pesou-se 2 g de mel, misturou-se com 50 mL de água destilada, transferiu-se para um balão de 250 mL e aferiu-se com água destilada. Retirou-se 50 mL desta solução e colocou-se num balão de 100 mL e voltou a aferir-se com água destilada.

Foi efetuada uma titulação preliminar a fim de determinar o volume necessário de água a adicionar à amostra para assegurar que a redução era efetuada a um volume constante. Num copo de 250 mL misturou-se 5 mL da solução A e da solução B de Fehling, adicionou-se 7 mL de água destilada, 14 mL da solução de mel contida na bureta, levou-se à ebulição e manteve-se durante 2 minutos. Após esse tempo adicionou-se 1 mL de azul-de-metileno e utilizou-se a nossa amostra como agente titulante, até ao aparecimento de um precipitado vermelho (análise efetuada em triplicado).

A titulação da amostra foi efetuada do mesmo modo que o referido anteriormente, exceto a quantidade de água destilada que se adicionou, que foi calculada

a partir de titulação anterior ( $25 - X = Y$  mL, sendo X a quantidade de solução de mel utilizada na titulação e Y a quantidade de água a adicionar), e 12,5 mL da solução diluída de mel contida na bureta (análise efetuada em triplicado).

Para calcular o teor em açúcares redutores, utilizou-se a seguinte expressão:

$$C = 2/P \times 1000/V$$

em que P corresponde ao peso, em g, da amostra de mel e o V ao volume, em mL, da solução de mel utilizada na titulação.

### **2.1.3 Preparação do mosto-mel**

Para obter uma bebida alcoólica com uma percentagem de aproximadamente 12% de etanol, pesou-se uma quantidade adequada de mel que foi dissolvido em água comercial engarrafada. A mistura mel-água foi suplementada com nutrientes comerciais (Enovit) (40g/hL) e após homogeneização da mistura acertou-se o pH a 3,7, com ácido tartárico (Sigma-Adrich). De seguida o mosto-mel foi pasteurizado a 65°C durante 15 minutos.

Para caracterizar o mosto-mel antes da fermentação determinaram-se alguns parâmetros enológicos: °Brix, pH, azoto assimilável, acidez total e açúcares redutores.

### **2.1.4 Hidratação da levedura**

As leveduras enológicas comerciais selecionadas para a produção de hidromel foram *S. cerevisiae* Lalvin ICV D47 (Lallemand, Montreal, Canada) e a *S. cerevisiae* QA23 (Lallemand, Montreal, Canadá).

De acordo com as instruções das fichas técnicas, as leveduras secas ativas (30g/hL) foram hidratadas numa proporção de 1 Kg de levedura para 10 L de mosto-mel. A suspensão foi colocada em banho-maria a 37°C durante 30 minutos, sendo agitada periodicamente.

### **2.1.5 Condições e monitorização da fermentação alcoólica**

Distribuíram-se 300 mL de mosto-mel em Erlenmeyers de 500 mL, previamente esterilizados, e inoculou-se com a levedura. As fermentações decorreram a 25°C, numa incubadora com agitação de 100 rpm (SIF 6000R Incubater Shaker). As fermentações

foram monitorizadas diariamente através da quantificação da biomassa celular, viabilidade celular e açúcares redutores.

A biomassa celular foi avaliada através da medição da densidade ótica a 640 nm num espectrofotómetro UV-Visível (UV-3100PC Spectrophotometer). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras com mosto-mel, que foi utilizado como branco.

As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) foram calculadas a partir do declive da relação linear entre os valores da densidade ótica e o tempo de fermentação, de acordo com a seguinte equação:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu t$$

em que  $\mu$  corresponde à taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo ( $\text{h}^{-1}$ ), e  $N_t$  e  $N_0$  às densidades populacionais, expressa pela densidade ótica a 640 nm, ao fim do tempo  $t$  e  $t_0$ , respetivamente.

A viabilidade celular foi avaliada através da quantificação das unidades formadoras de colónias (UFC's) em meio sólido Yeast Peptone Dextrose (YPD – 20 g/L de glucose, 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de agar). Quando necessário efetuaram-se diluições e as placas foram incubadas a 25°C durante 3-5 dias.

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) de acordo com o procedimento proposto por Miller (1959), usando a glucose como padrão. Colocaram-se 500  $\mu\text{L}$  da amostra centrifugada num tubo de ensaio e adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de reagente de DNS. Os tubos foram colocados durante 5 minutos num banho-maria a 100°C, e após esse tempo arrefeceram-se à temperatura ambiente. De seguida foram adicionados 5 mL de água destilada, agitou-se e leu-se a absorvância num espectrofotómetro UV-Visível a 540 nm. Preparou-se um ensaio com água destilada para efetuar o branco do espectrofotómetro. Quando necessário efetuaram-se diluições da amostra com água destilada. Os resultados dos açúcares redutores foram expressos em g/L.

No final da fermentação alcoólica, o hidromel foi clarificado por centrifugação (Centrifuge 5410 R eppendorf) para avaliar as suas características físico-químicas analisando diversos parâmetros enológicos.

## **2.1.6 Caracterização físico-química do mosto-mel e hidromel**

No início e fim das fermentações alcoólicas foram realizadas análises físico-químicas. Para avaliar as características do mosto-mel foram determinados o °Brix, pH, azoto assimilável, acidez total e açúcares redutores, enquanto que, para a qualidade do hidromel produzido foram determinados o teor alcoólico, pH, acidez total, acidez volátil, sulfuroso total, azoto assimilável e açúcares redutores. Determinou-se ainda o rendimento em etanol de cada fermentação.

### **2.1.6.1 °Brix**

O °Brix foi determinado por refratometria no mosto-mel utilizando um refratômetro portátil (Handheld Refractometer, 0-50% Brix, ATC) (Organização Internacional da Vinha e do Vinho, OIV, 2006).

### **2.1.6.2 pH**

O pH do mosto-mel e hidromel foi determinado por leitura direta utilizando um medidor de pH Meter Basic 20, (OIV, 1990). Antes de se efetuar a leitura do pH calibrou-se o aparelho numa solução tampão com pH 7.

### **2.1.6.3 Azoto assimilável**

O azoto assimilável foi determinado na solução mosto-mel e no hidromel, pelo método do formaldeído de acordo com a metodologia descrita por Aerny (1996).

Num copo de 50 mL colocaram-se 10 mL de amostra clarificada e 15 mL de água destilada e acertou-se o pH a 8,1 com NaOH 0,1N usando um medidor de pH (Meter Basic 20). Adicionou-se 2,5 mL de formaldeído a pH 8,1, esperou-se 5 minutos e titulou-se com NaOH 0,05 N até atingir um valor de pH 8,1 (Pereira *et al.*, 2013).

Os resultados foram calculados pela seguinte expressão:

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

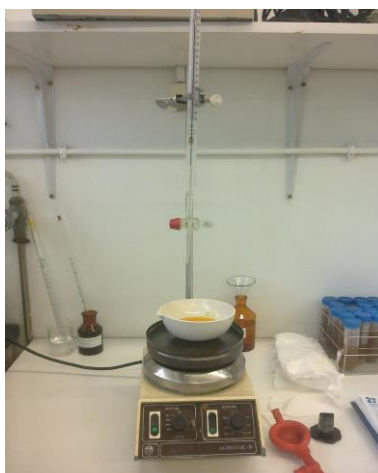
#### 2.1.6.4 Acidez total

A acidez total do mosto-mel e do hidromel foram determinadas com base no método proposto pela OIV (1990) (Figura5).

O método consiste numa titulação potenciométrica com NaOH 0,1N na presença de azul de bromotimol como indicador de pH. Assim, num almofariz de porcelana, com uma barra magnética, adicionou-se 30 mL de água destilada, 10 mL de amostra e 1 mL de azul de bromotimol, e titulou-se com NaOH 0,1N até se verificar a mudança de cor, de um laranja para um verde fugindo para o azul (Pereira *et al.*, 2013).

Os resultados da acidez total, expressos em g/L de ácido tartárico, foram determinados pela seguinte expressão:

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



**Figura 5:** Determinação da acidez total.

#### 2.1.6.5 Açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizada conforme o descrito no ponto 2.1.5.

#### 2.1.6.6 Teor alcoólico

O título alcoométrico volúmico do hidromel foi determinado por ebulliometria, método usual da OIV (1990).

Inicialmente verificou-se a temperatura de ebulição da água e marcou-se no disco do aparelho a temperatura registada. De seguida, colocou-se o hidromel no ebulliómetro (Figura 6) para determinar a sua temperatura de ebulição e verificou-se no disco o teor alcoólico correspondente à temperatura lida (Pereira *et al.*, 2013). Os resultados expressaram-se em % volume.



**Figura 6:** Ebulliómetro.

#### **2.1.6.7 Acidez volátil**

A acidez volátil do hidromel foi determinada pelo método descrito pela OIV (1990) e consiste numa titulação dos ácidos voláteis que foram obtidos por destilação utilizando o aparelho Cazenave-Ferré (Figura 7).

Colocou-se 300 mL de água destilada nos matrizes do equipamento. Adicionou-se 10 mL de hidromel no borbulhador do aparelho, colocou-se o borbulhador dentro dos matrizes e recolheu-se 100 mL do destilado. Ao destilado adicionaram-se 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com NaOH 0,1N até ocorrer mudança de cor, de transparente para cor-de-rosa (Pereira *et al.*, 2013).

Os resultados da acidez volátil foram obtidos através da fórmula:

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



**Figura 7:** Aparelho Cazenave-Ferré.

#### **2.1.6.8 Sulfuroso total**

A determinação do sulfuroso total do hidromel foi efetuada de acordo com a metodologia de Ripper descrita pela OIV (1990) como método rápido. A determinação baseia-se na titulação iodométrica direta em meio ácido (Curvelo – Garcia, 1998). Num almofariz de porcelana colocou-se 25 mL de hidromel e 10 mL de NaOH 1N, agitou-se e deixou-se repousar durante 5 minutos. De seguida adicionou-se 2,5 mL de solução de cozimento de amido 1% e 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/3. Titulou-se com solução de iodo 0,02N até ocorrer a mudança de cor, de laranja claro para roxo escuro (Pereira *et al.*, 2013).

Os resultados do sulfuroso total foram obtidos através da fórmula:

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

#### **2.1.7 Quantificação de glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC**

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram analisados utilizando um sistema HPLC Varian, equipado com um injetor Rheodyne de 20 µL, uma coluna da Supelco Gel C-610H (300 × 17,8 mm) a 35°C e um detetor de índice refrativo RI-4 da Varian. A eluição foi alcançada com uma fase móvel que consistia em ácido fosfórico 0,1% (v/v) com um caudal de 0,5 mL/min. Os dados foram gravados e integrados pelo sistema informático Star Chromatography Workstation da Varian.

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram quantificados com base na área dos seus picos e comparação com as curvas de calibração obtidas com os padrões correspondentes (Pereira *et al.*, 2014).

### **2.1.8 Rendimento da fermentação**

Na produção de hidromel, calculou-se o rendimento da fermentação em etanol, de acordo com a seguinte equação:

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

## **2.2 Produção de Vinagre de Mel**

Para avaliar qual dos 4 diferentes tipos de hidromel produzidos era mais rentável para a produção de vinagre de mel, foram realizados 4 ensaios em triplicado.

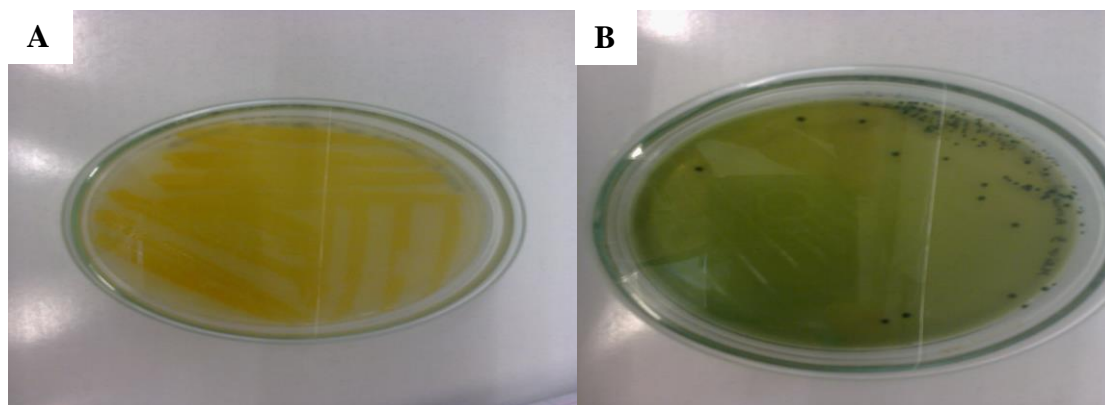
As fermentações acéticas foram monitorizadas através da quantificação do etanol e do ácido acético. No final de cada fermentação foram avaliados alguns parâmetros, como o pH e os teores de etanol e ácido acético.

### **2.2.1 Isolamento e crescimento das bactérias acéticas**

O isolamento das bactérias acéticas foi realizado a partir de vinhos tintos já existentes no laboratório. Utilizou-se 3 meios de cultura seletivos para bactérias acéticas, designadamente, o meio de Frateur (Frateur – 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de agar, 20 g/L de carbonato de cálcio e 20 mL/L de etanol), meio Glucose Yeast  $\text{CaCO}_3$  (GYC – 3g/L de glucose, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 15 g/L de agar e 7,5 g/L de carbonato de cálcio) (Figura 8A) e meio de diferenciação de Carr (Carr – 30 g/L de extrato de levedura, 50 mg/L de cicloheximida, 1 mL/L de verde bromocresol a 2,2%, 20 g/L de agar e 20 mL/L de etanol) (Figura 8B).

Após identificação das bactérias ao microscópio, estas foram congeladas em glicerol a 30% (v/v) para posterior utilização na produção de vinagre.

Para iniciar a produção de vinagre, as bactérias acéticas foram colocadas a crescer em meio líquido, antes de se proceder à sua inoculação no hidromel. O meio utilizado neste processo foi o meio GYC, pois foi o meio onde se obtiveram melhores resultados no isolamento das bactérias acéticas. Em quatro Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, foram colocadas quatro colónias diferentes das bactérias, obtidas anteriormente, e colocou-se numa incubadora, a 37° C com uma agitação de 150 rpm, até se verificar o crescimento das bactérias.



**Figura 8:** Crescimento de bactérias acéticas em meio sólido. **A-** meio Glucose Yeast  $\text{CaCO}_3$ . **B-** meio de Carr.

### 2.2.2 Monitorização da fermentação acética

Para a obtenção de vinagre, colocou-se 100 mL de hidromel em erlenmeyers de 250 mL e foi-se adicionando aos poucos inóculo de bactérias acéticas, até se obter uma densidade ótica de 0,2. A densidade ótica foi medida a 540 nm num espectrofotómetro UV-Visível (UV-3100PC Spectrophotometer), tendo sido utilizado como branco o hidromel.

Os Erlenmeyers foram colocados numa incubadora à temperatura ambiente com uma agitação de 150 rpm. A fermentação foi monitorizada diariamente através da quantificação do ácido acético e do etanol por HPLC.

A metodologia utilizada nos ensaios por HPLC foi a descrita no ponto 2.1.7.

No final da fermentação acética, o vinagre foi clarificado por centrifugação para avaliar as suas características físico-químicas através de diversos parâmetros.

### 2.2.3 Caracterização físico-química do vinagre

Para determinar as características do vinagre de mel, no final da fermentação, foram avaliados o pH, ácido acético e etanol.

#### 2.2.3.1 pH

A determinação do pH foi realizada conforme descrito no ponto 2.1.6.2.

### 2.2.3.2 Quantificação do ácido acético e etanol final por HPLC

A quantificação do ácido acético e etanol final foi realizada de acordo com o descrito no ponto 2.1.7.

### 2.3 Determinação de compostos fenólicos totais

Na determinação de compostos fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, (1999). Foram determinados os fenóis totais no mel, hidromel e vinagre de mel, a fim de se observar a sua variação ao longo das duas fermentações.

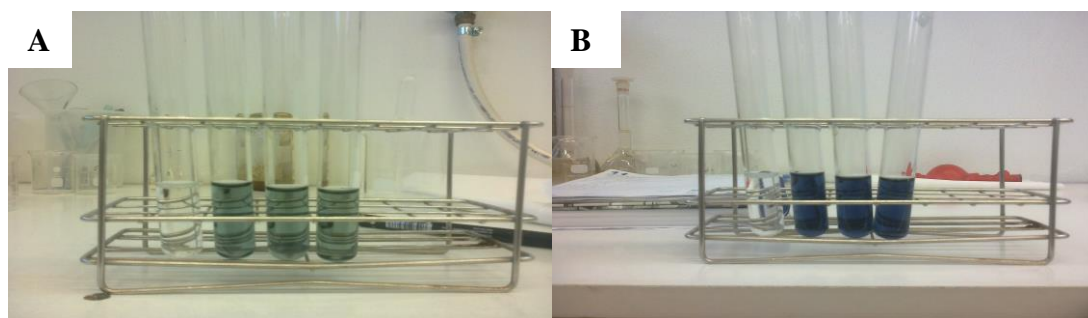
#### 2.3.1 Preparação da solução de mel, hidromel e vinagre de mel

A solução de mel foi obtida pesando cerca de 2 g de mel que foram dissolvidas num balão de 20 mL. Já as soluções de hidromel e vinagre de mel foram obtidas pipetando 2 mL de hidromel ou vinagre de mel que foram dissolvidos em balões de 20 mL. Todas as soluções foram dissolvidas em água desionizada.

#### 2.3.2 Análise de compostos fenólicos totais

Na análise dos compostos fenólicos totais das 3 amostras (análise efetuada em triplicado) misturou-se 0,5 mL das soluções preparadas anteriormente, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2 mL de carbonato de sódio a 0,75%.

A solução resultante ficou a repousar durante 2 horas à temperatura ambiente, e foi medida a sua absorvância a 760 nm (Figura 9).

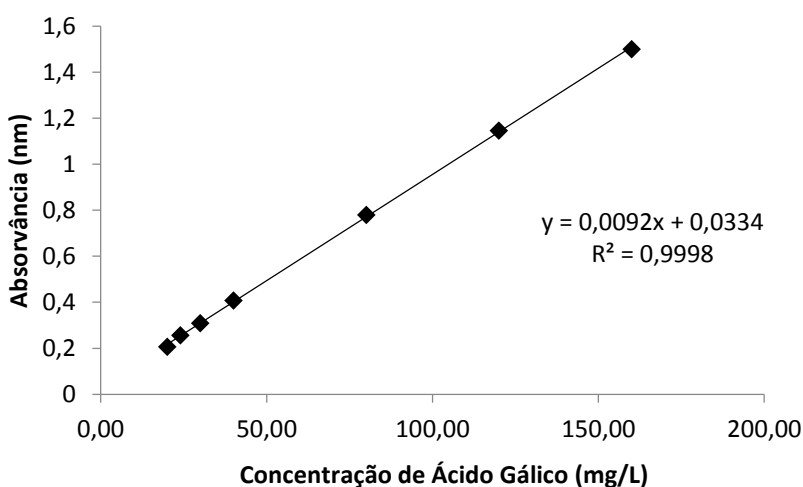


**Figura 9:** Determinação dos compostos fenólicos totais. **A-** Início. **B-** Ao fim de 2 horas.

Para a determinação da curva de calibração (Figura 10) para análise dos fenóis totais, o composto padrão utilizado foi o ácido gálico. A solução-mãe foi preparada por pesagem de 0,1 g de ácido gálico que foi dissolvido em 100 mL de água desionizada.

As concentrações usadas foram obtidas transferindo volumes de 0,5, 0,6, 0,75, 1, 2, 3 e 4 mL da solução-mãe para balões de 25 mL, que foram aferidos com água desionizada.

O branco foi preparado com 0,5 mL de água desionizada, 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2 mL de carbonato de sódio. Decorridas 2 horas, foram efetuadas leituras a 760 nm.



**Figura 10:** Reta de calibração para os compostos fenólicos totais.

## 2.4 Determinação de flavonoides totais

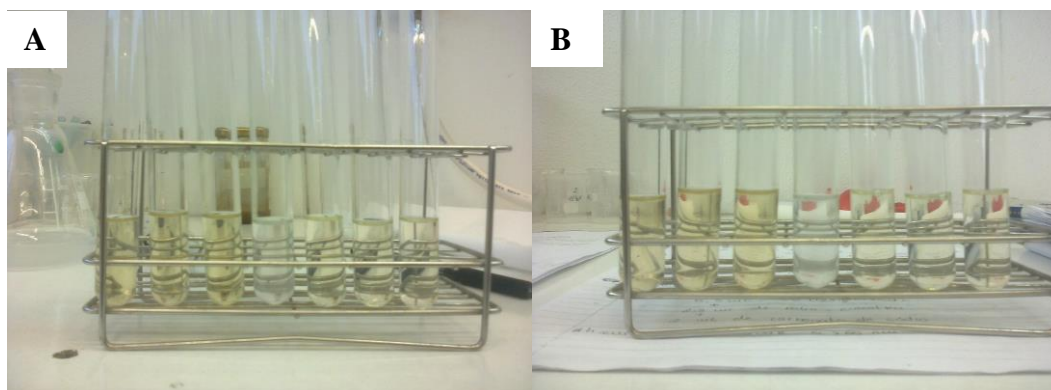
Na determinação dos flavonoides totais usou-se o método de Woisky & Salatino (1998). Foram determinados os flavonoides totais no mel, hidromel e vinagre de mel.

A preparação das soluções foi realizada conforme o descrito no ponto 2.3.1.

### 2.4.1 Análise de flavonoides totais

A análise dos flavonoides totais nas diferentes soluções foi feita por mistura de 2,5 mL de cada produto com 2,5 mL de cloreto de alumínio a 2%, sendo esta mistura preparada em triplicado.

A solução obtida ficou em repouso no escuro durante 1 hora, à temperatura ambiente, de seguida mediu-se a sua absorvância a 420 nm (Figura 11).

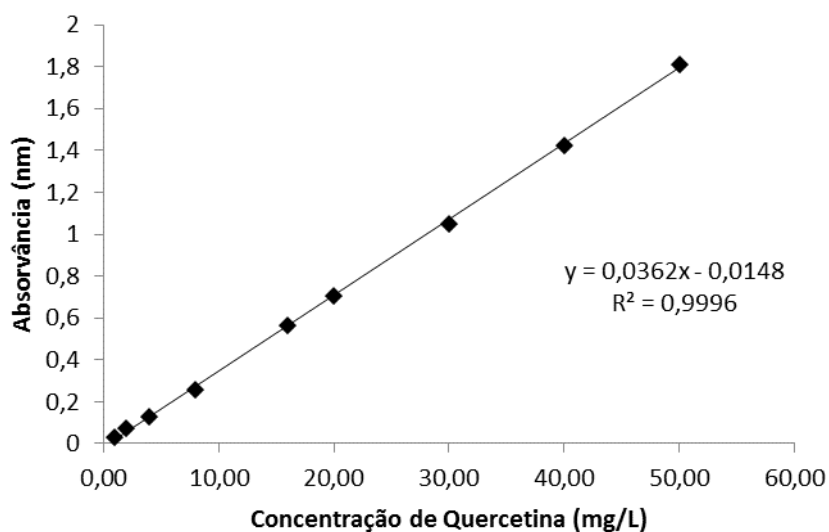


**Figura 11:** Determinação de flavonoides totais. **A-** Início. **B-** Ao fim de 1 hora.

Na determinação da curva de calibração para análise dos flavonoides totais (Figura 12) usou-se como composto padrão a quercetina. Para a preparação da solução-mãe pesaram-se 0,1 g de quercetina para um balão de 100 mL que foi aferido com etanol.

As concentrações utilizadas foram obtidas por medição dos volumes 0,1 mL para um balão de 100 mL, 0,1 e 0,2 mL para balões de 50 mL, 0,2, 0,4, 0,5, 0,75 e 1 mL para balões de 25 mL e 1 mL para um balão de 20 mL, sendo os balões volumétricos aferidos com etanol.

O branco foi preparado com 2,5 mL de etanol e 2,5 mL do reagente cloreto de alumínio. Ao fim de 1 hora foram efetuadas as leituras a 420 nm.



**Figura 12:** Reta de calibração para os flavonoides totais.

## 2.5 Tratamento dos resultados

A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 19.0. O cumprimento do requisito da ANOVA, nomeadamente a homogeneidade de variância foi avaliada através do teste de Levene. Todas as variáveis dependentes foram analisadas através da ANOVA a um fator e quando se verificaram diferenças significativas, as médias foram comparadas usando o teste de Tukey, teste de comparações múltiplas. Todos os testes estatísticos foram realizados para um nível de significância de 5 %.



# **CAPÍTULO 3:**

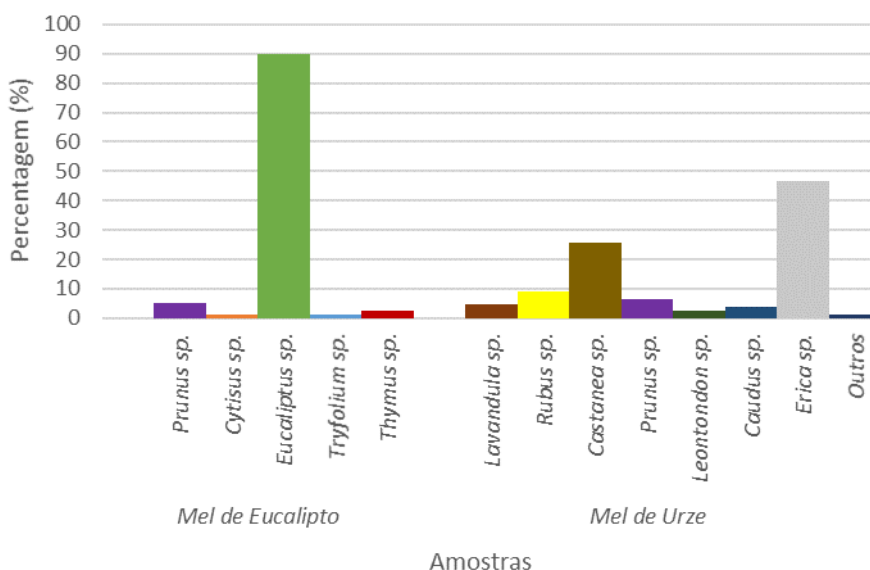
## *Resultados e Discussão*

### 3 Otimização da produção de vinagre de mel

#### 3.1 Análises ao mel

##### 3.1.1 Análise polínica

A identificação e contagem do pólen, por análise microscópica, permite identificar a origem floral do mel. Na figura 13 estão identificados e quantificados os tipos de pólen presentes nos méis utilizados na produção de hidromel.



**Figura 13:** Caracterização das amostras de mel em estudo

Segundo Maia *et al.* (2005), para o mel ser considerado monofloral tem de possuir mais de 45% de um determinado tipo de pólen. No entanto, dependendo do tipo de mel existem algumas exceções, como é o caso do mel de castanheiro que necessita de possuir pelo menos 90% de pólen de *Castanea sp.* (Anklam, 1998) e o mel de lavandula que só necessita de apresentar 15% de pólen da espécie *Lavandula sp.* (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia et al., 2003). Analisando a figura 13, verifica-se que os méis em estudos são monoflorais, apresentando como pólen dominante o de *Eucalyptus sp.* (89,95%) e *Erica sp.* (46,75%) para o mel de eucalipto e para o mel de urze, respetivamente.

### 3.1.2 Açúcares redutores

Os monossacarídeos, glucose e frutose, são os principais açúcares redutores presentes no mel (Küçük, 2007). Os resultados obtidos para os açúcares redutores encontram-se sumariados na tabela 1.

**Tabela 1:** Análise dos açúcares redutores do mel

Amostra	Açúcares Redutores (%)
Mel de Urze	66,67 ± 0,44
Mel de Eucalipto	68,97 ± 0,48

De acordo com o referido no Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, os nossos resultados para os açúcares redutores dos méis encontram-se dentro do estipulado (mínimo 60 g/100 g de mel). De acordo com a tabela 1, o mel de eucalipto (mel claro) contém mais glucose e frutose que o mel de urze (mel claro).

### 3.2 Produção de hidromel utilizando mel de urze e de eucalipto e as leveduras LSA ICV D47 e QA23

Nesta parte do trabalho avaliou-se o desempenho de duas estirpes de *S. cerevisiae* nos dois tipos de méis, para a produção de hidromel, a fim de determinar qual seria a mais adequada para a produção de hidromel.

#### 3.2.1 Performance das diferentes fermentações alcoólicas

Conforme o descrito no material e métodos, o mosto-mel utilizado nas diferentes fermentações foi preparado de modo a obter uma bebida com um teor alcoólico de 12%.

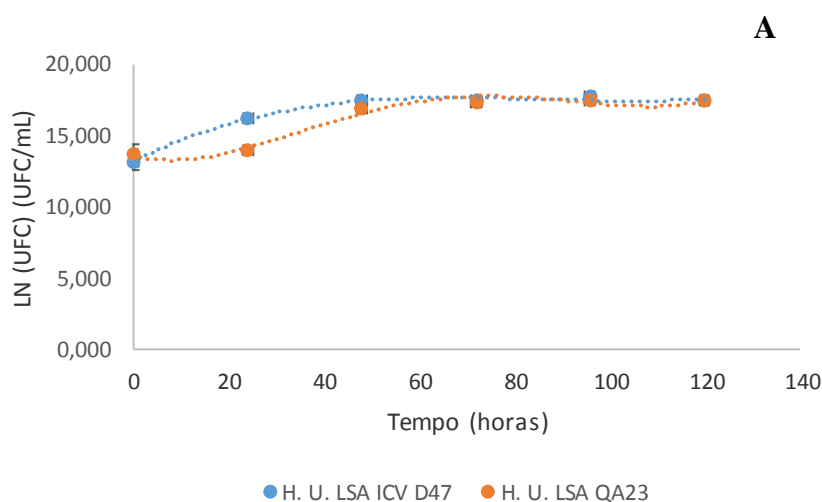
Depois da preparação do mosto-mel, antes da pasteurização, foram determinadas as suas características físico-químicas, como o pH, °Brix, azoto assimilável, acidez total e açúcares redutores. Os valores obtidos nessas análises encontram-se na tabela 2.

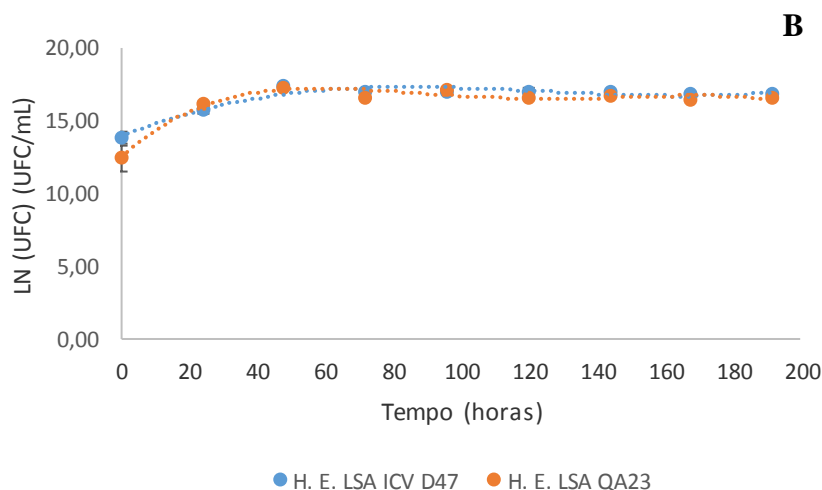
**Tabela 2:** Análises físico-químicas do mosto-mel de Urze e Eucalipto

Amostra	pH	°Brix	Azoto Assimilável (mg N/L)	Acidez Total (g/L ácido tartárico)	Açúcares Redutores (g/L)
Mel de Urze	3,70 ± 0,01	24,5 ± 0,00	189 ± 1	2,13 ± 0,06	357,15 ± 0,03
Mel de Eucalipto	3,74 ± 0,01	24,0 ± 0,00	168 ± 2	1,96 ± 0,06	301,73 ± 0,03

Verifica-se que todos os parâmetros físico-químicos, com a exceção do pH, foram superiores no mosto-mel preparado a partir do mel de urze. Os valores obtidos por Pereira *et al.*, (2014) em hidromel de mel multi floral para o azoto assimilável e para a acidez total foram inferiores aos determinados neste trabalho.

Tal como foi referido anteriormente, para monitorizar as diferentes fermentações alcoólicas foram determinados vários parâmetros ao longo do processo, a referir: taxa específica de crescimento, viabilidade celular e açúcares redutores (Fig. 14 e 15 e Tabela 3).





**Figura 14:** Variação da viabilidade das células *S. cerevisiae* em função do tempo. **A-** fermentações no mosto-mel de urze. **B-** fermentações no mosto-mel de eucalipto.

Da análise da figura 14, verifica-se que a fase exponencial de crescimento de ambas as leveduras, quando crescidas nos dois tipos de hidromel teve início logo após a inoculação.

A fase estacionária das estirpes LSA QA23 e ICV D47 iniciou-se 48 horas após a inoculação nos hidroméis de urze e de eucalipto. A fermentação para ambas as leveduras no hidromel de urze terminou às 120 horas, enquanto no hidromel de eucalipto a sua duração foi de 192 horas.

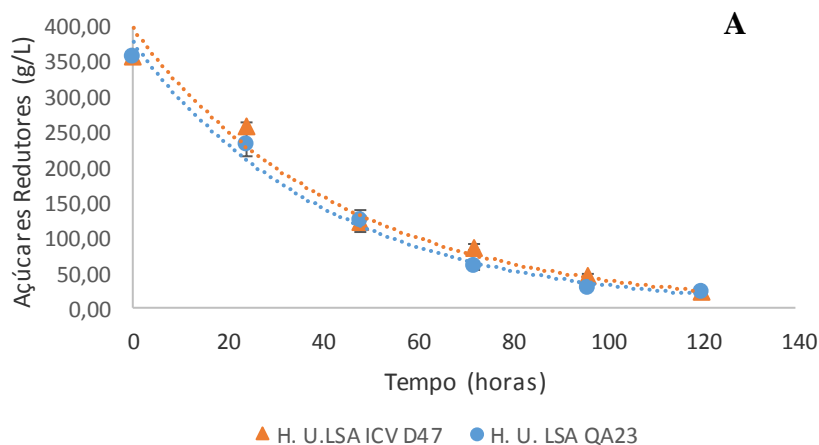
Pereira *et al.*, (2014), verificou que, para as duas leveduras em estudo, crescidas em mel escuro, a fase estacionária teve início às 48 horas e a fermentação terminou por volta das 120 horas.

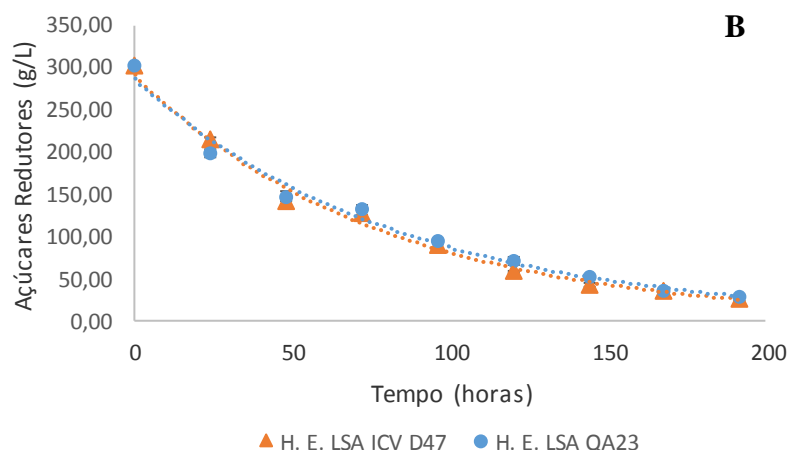
**Tabela 3:** Taxa específica de crescimento e biomassa final do hidromel

Fermentação	$\mu_c$ (h <sup>-1</sup> )	Biomassa final (UFC/mL)
Hidromel Urze LSA ICV D47	0,16 ± 0,68d	4,13x10 <sup>7</sup> ± 5,16x10 <sup>6</sup> b
Hidromel Urze LSA QA23	0,12 ± 0,70c	4,03x10 <sup>7</sup> ± 2,91x10 <sup>6</sup> b
Hidromel Eucalipto LSA ICV D47	0,05 ± 0,71b	3,65x10 <sup>7</sup> ± 1,35x10 <sup>6</sup> ab
Hidromel Eucalipto LSA QA23	0,07 ± 0,79a	3,23x10 <sup>7</sup> ± 9,75x10 <sup>5</sup> a

As letras (a, b e c) representam que os méis são diferentes pelo teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . Letras iguais representam que não há diferenças significativas.

A taxa específica de crescimento variou entre 0,05 e 0,16 h<sup>-1</sup> na estirpe LSA ICV D 47 crescida em hidromel de eucalipto e em hidromel de urze, respetivamente. No que diz respeito a este parâmetro verificaram-se diferenças significativas entre estirpes, tanto no hidromel de mel de urze como no hidromel de mel de eucalipto. O tipo de hidromel também influenciou significativamente o crescimento das leveduras, sendo a taxa específica de crescimento, para ambas, muito superior no mel de urze. Relativamente à biomassa final o valor máximo obteve-se para a estirpe LSA ICV D47 quando crescida no hidromel de urze e o mais reduzido para a estirpe LSA QA23 no hidromel de eucalipto.





**Figura 15:** Variação dos açúcares redutores ao longo do tempo. **A-** fermentações no mosto-mel de urze. **B-** fermentações no mosto-mel de eucalipto.

Em relação ao consumo de açúcares redutores o comportamento das duas estirpes de leveduras foi idêntico, tanto no mosto mel de urze como no mosto mel de eucalipto, verificando-se um consumo progressivo durante as primeiras 100 horas de fermentação. No mosto mel de urze o consumo terminou às 120 horas e no mosto mel de eucalipto às 192 horas.

### 3.2.2 Caracterização físico-química do produto final

A fim de avaliar a qualidade final dos hidroméis produzidos quantificaram-se os produtos da fermentação, nomeadamente o sulfuroso total, azoto assimilável, acidez total, teor alcoólico, acidez volátil, pH e açúcares redutores finais. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4:** Análises físico-químicas do hidromel

Fermentação	Sulfuroso Total (mg/L)	Azoto Assimilável (mg N/L)	Acidez Total (g/L ácido tartárico)	Teor Alcoólico (%)	Acidez Volátil (g/L ácido acético)	pH	Açúcares Redutores (g/L)
Hidromel Urze LSA ICV D47	24,75 ± 1,48b	35,00 ± 0,00b	5,73 ± 0,17a	12,17 ± 0,12c	0,84 ± 0,06b	3,45 ± 0,04a	22,81 ± 0,32b
Hidromel Urze LSA QA23	21,33 ± 1,48c	35,50 ± 0,50b	5,24 ± 0,23a	12,13 ± 0,15c	0,63 ± 0,08a	3,50 ± 0,01a	22,89 ± 0,29c
Hidromel Eucalipto LSA ICV D47	17,07 ± 1,48a	27,17 ± 0,76a	4,30 ± 0,50b	11,13 ± 0,15a	0,96 ± 0,00b	3,04 ± 0,01b	25,98 ± 0,12a
Hidromel Eucalipto LSA QA23	17,92 ± 0,00a	27,17 ± 1,04a	3,65 ± 0,09b	11,67 ± 0,15b	0,58 ± 0,03a	3,05 ± 0,03b	28,22 ± 0,47a

As letras (a, b e c) representam que os méis são diferentes pelo teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . Letras iguais representam que não há diferenças significativas.

O dióxido de enxofre tem como função proteger o vinho da ação de bactérias e impedir a ação de enzimas oxidativas. O SO<sub>2</sub>, além da proteção enzimática, reage fortemente com o oxigénio devido à alta afinidade por este substrato. Ao impedir a reação do oxigénio com os compostos orgânicos do vinho, inibe os processos de oxidação, preservando a sua qualidade e a longevidade (Stefenon, 2008). Convém salientar que, a ausência de SO<sub>2</sub> total em fermentações vinárias é pouco frequente, uma vez que as leveduras produzem este composto durante a fermentação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Da análise da tabela 4, verifica-se que a concentração de SO<sub>2</sub> total foi superior no mosto mel produzido a partir de mel de urze, variando entre 24,75 e 21,33 mg/L, para a estirpe LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente. As fermentações levadas a cabo no mosto mel de eucalipto apresentaram níveis de SO<sub>2</sub> total que oscilaram entre 17,07 e 17,92 mg/L, para a estirpe LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente. Relativamente a este parâmetro não se verificaram diferenças significativas no hidromel de eucalipto produzido pelas duas estirpes em estudo, no entanto o teor de SO<sub>2</sub> encontrado neste hidromel foi significativamente diferente do obtido no hidromel de urze para ambas as estirpes. No hidromel de urze o teor de SO<sub>2</sub> foi também influenciado pela estirpe, observando-se diferenças significativas entre elas. Esta diferença de valores, entre os dois tipos de mel, poderá dever-se, ao facto, de a composição do mel de urze facilitar o crescimento das leveduras e conseqüentemente a diminuição da acumulação de substâncias indesejáveis. Convém salientar que em nenhuma das fermentações o teor de SO<sub>2</sub> ultrapassou os limites estipulados por Ribéreau-Gayon (2006) (30 mg/L).

Em todas as fermentações, no final do processo, ficou azoto por consumir sendo a quantidade mais elevada no mosto-mel de urze, ou seja, aproximadamente 35 mg azoto/L nas fermentações conduzidas por ambas as leveduras. Para este parâmetro não se verificaram diferenças significativas entre as leveduras, tanto no hidromel de urze como no hidromel de eucalipto. No entanto, o azoto assimilável residual do hidromel de urze foi significativamente diferente do quantificado no hidromel de eucalipto. Estes resultados estão de acordo com as observações de Mendes-Ferreira *et al.*, (2010), também estes autores verificaram a presença de azoto residual na produção de hidromel conduzida por *S. cerevisiae*. De acordo com o descrito por Pereira *et al.*, (2013) o azoto

residual provém do aminoácido prolina, substância não utilizada pelas leveduras, e que representa 50 a 85% do azoto total presente no mel. Por outro lado, o método utilizado (método do formaldeído) apresenta apenas uma taxa de recuperação de 23% para a prolina.

A acidez total é um parâmetro muito importante nas bebidas fermentadas, pois está relacionada com a caracterização do produto, identificação de fraudes, controlo de alterações indesejáveis por microrganismos (Ávila, 2002).

Os valores obtidos para a acidez total variaram entre 3,65 e 5,73 g/L nas fermentações levadas a cabo pela levedura LSA QA23 no mosto mel de eucalipto e pela levedura LSA ICV D47 no mosto mel de urze. Para ambas as leveduras a acidez total foi superior no hidromel de urze, não se tendo verificado diferenças significativas entre elas. Também não se observaram diferenças significativas na acidez total produzida pelas duas leveduras nos hidroméis de eucalipto. No entanto, este parâmetro diferiu significativamente entre os dois tipos de hidromel. De acordo com o Regulamento (CE) n° 491/2009, a acidez total dos vinhos tem de ser superior ou igual a 3,5 g/L de ácido tartárico, sendo assim, os valores obtidos nas diferentes fermentações encontram-se dentro do legislado.

Segundo Navrátil *et al.*, (2001), o hidromel é uma bebida alcoólica que contém entre 9-18% de álcool por volume, o que está de acordo com os resultados obtidos para as nossas fermentações. A quantidade de etanol produzido no mosto mel de urze variou entre os 12,13 e 12,17% para as leveduras LSA QA23 e LSA ICV D47, respetivamente. No mosto mel de eucalipto os valores obtidos foram 11,13% para a estirpe LSA ICV D47 e 11,67% para a levedura LSA QA23. No hidromel de urze não se verificaram diferenças significativas entre as duas estirpes de leveduras utilizadas na produção. O teor alcoólico do hidromel de urze foi superior e significativamente diferente do valor obtido no hidromel de eucalipto.

A acidez volátil acima de certos valores, pode conferir ao produto final um sabor ou aroma desagradável, o que torna a bebida imprópria para consumo implicando, assim, perdas económicas para o produtor. A formação de ácido acético pode ocorrer em qualquer etapa da fermentação alcoólica (Sroka e Tuszynski, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Verifica-se que os valores obtidos para esse parâmetro, nas nossas fermentações, estão abaixo do limite legal para os vinhos brancos e rosés (1,4 g/L) (Regulamento (CE)

nº 491/2009). Estes variaram entre 0,58 e 0,96 g/L de ácido acético para a LSA QA23 e LSA ICV D47, respetivamente, nos hidroméis de eucalipto. A acidez volátil produzida pela levedura LSA ICV D47 nos dois tipos de hidromel foi superior à formada pela levedura LSA QA23, tendo-se observado diferenças significativas entre a produção de cada uma delas.

O pH é uma das características mais importantes das bebidas fermentadas, pois além de interferir na cor, exerce um efeito acentuado sobre o sabor. Bebidas fermentadas com elevado pH são mais suscetíveis às alterações oxidativas e biológicas, uma vez que o teor de dióxido de enxofre ativo é proporcionalmente menor (Aerny, 1985). Os valores de pH obtidos no hidromel de urze nas fermentações conduzidas por ambas as leveduras foram ligeiramente superiores aos determinados nos hidroméis de eucalipto. Não se verificaram diferenças significativas entre leveduras, quer no hidromel de urze quer no hidromel de eucalipto. No entanto, este parâmetro, foi significativamente diferente nos dois tipos de hidromel. Os nossos resultados corroboram as observações de Sroka e Tuszynski (2007), segundo as quais nos primeiros dias da fermentação do mosto existe uma diminuição do pH, causada pela produção de dois ácidos principais, o ácido acético e o succínico. De facto, o pH do mosto mel de urze diminuiu de 3,7 para 3,45 e 3,50 quando se utilizaram as estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente, e o do mosto mel de eucalipto de 3,74 para 3,04 na presença da estirpe LSA ICV D47 e para 3,05 na fermentação conduzida pela estirpe LSA QA23.

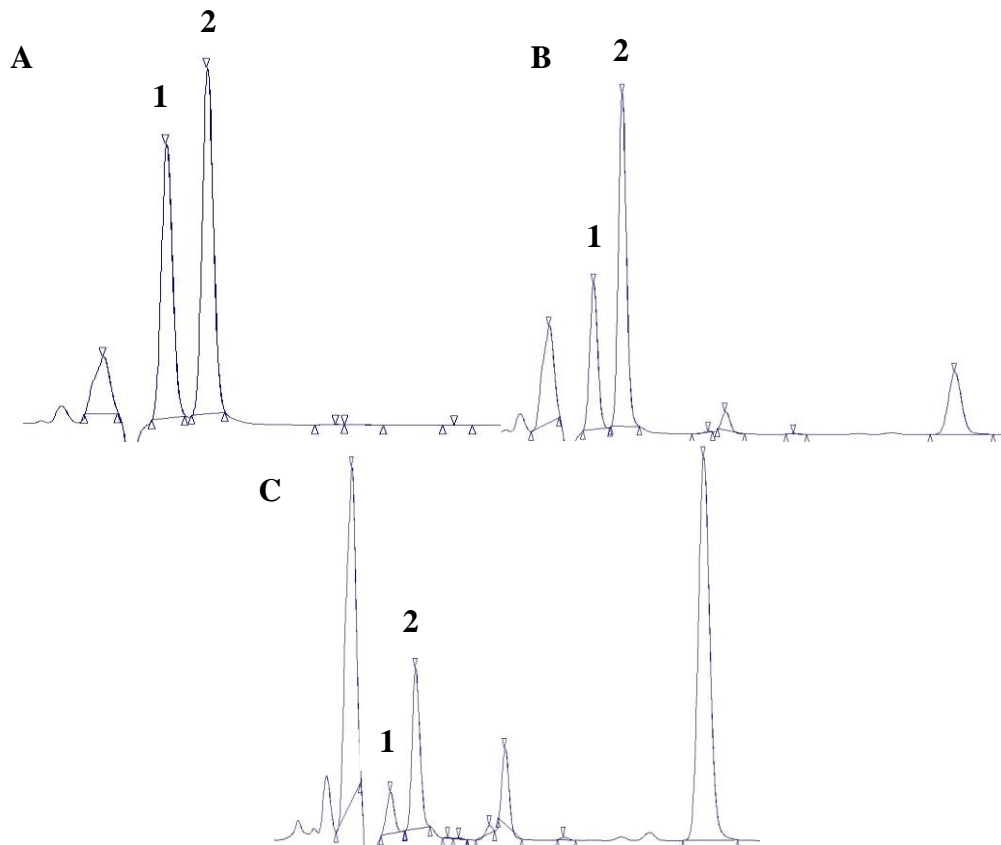
Em relação aos açúcares redutores finais, os valores obtidos variaram entre 22,81 g/L no hidromel de urze fermentado pela estirpe LSA ICV D47 e 28,22 g/L no hidromel de eucalipto inoculado com a levedura LSA QA23. Os valores mais elevados foram observados no hidromel de eucalipto, tal como era de prever uma vez que a “performance” fermentativa de ambas as leveduras neste tipo de hidromel foi inferior. No hidromel de eucalipto não se verificaram diferenças significativas entre as duas estirpes de leveduras. Relativamente ao hidromel de urze o comportamento das leveduras foi significativamente diferente. Verificou-se ainda que os açúcares redutores quantificados no hidromel de urze foram significativamente diferentes dos do hidromel de eucalipto.

### 3.2.3 Resultados do HPLC e rendimento da fermentação

Os resultados obtidos para a glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC e o rendimento da fermentação encontram-se descritos na tabela 5.

Da análise da tabela 5 verifica-se que os teores de glucose no hidromel de urze diminuíram de 85,76 para 2,64 e 2,62 g/L e os de frutose de 105,10 para 3,04 e 3,78 g/L, quando se utilizaram as estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente. Relativamente ao hidromel de eucalipto a concentração de glucose diminuiu de 73,62 para 1,89 e 2,02 g/L e os de frutose de 102,04 para 0,09 e 0,02 g/L, nas fermentações conduzidas pelas estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente. Tanto no hidromel de urze como no hidromel de eucalipto não se verificaram diferenças significativas entre leveduras, para o teor de glucose e frutose. Contudo, para esses parâmetros, foram detetadas diferenças significativas entre os dois tipos de hidroméis produzidos. Em ambos os hidroméis a glucose e frutose presentes no mosto-mel foram quase totalmente consumidos. A baixa concentração de açúcares residuais indica que o hidromel é pouco suscetível a refermentações, o que poderia levar a deterioração do produto final do ponto de vista das suas características sensoriais. Convém salientar que como referido anteriormente, quando se determinaram os açúcares redutores pelo método do DNS ficaram açúcares por fermentar. Porém, tal como se verificou pela análise cromatográfica trata-se de açúcares presentes no mel não fermentescíveis pelas leveduras.

Inicialmente, a taxa de consumo da glucose foi maior do que a da frutose, demonstrando o consumo preferencial do primeiro açúcar em relação ao segundo (Figura 16). Estes resultados são corroborados pelas observações de Fleet (1998), Berthels *et al.* (2004) e de Pereira (2008), os quais verificaram que apesar da glucose e da frutose serem consumidas ao longo da fermentação, as estirpes de *S. cerevisiae* têm preferência pela glucose.



**Figura 16:** Determinação da glucose e frutose por HPLC no mosto-mel de urze com a LSA QA23. **A-** no tempo inicial. **B-** após 48 horas de fermentação. **C-** no final da fermentação. **1-** glucose. **2-** frutose.

No hidromel de urze o teor de etanol foi de 11,85 e de 11,33 g/L quando se utilizaram as estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente, enquanto que no hidromel de eucalipto obtiveram-se valores de 10,37 g/L para a estirpe LSA ICV D47 e 10,10 g/L para a estirpe LSA QA23. Segundo Pereira *et al.* (2009), o etanol é um metabolito primário, e como tal, espera-se que a sua produção se realize durante a fase exponencial, no entanto tal como verificado pelos autores referidos anteriormente no nosso trabalho a sua produção ocorreu também durante a fase estacionária.

Não se registaram grandes diferenças no teor em etanol determinado por HPLC e pelo método recomendado pela OIV (1990). No hidromel de eucalipto, para as duas leveduras, não se verificaram diferenças significativas. Relativamente ao hidromel de urze verificou-se diferenças significativas entre ambas. O etanol no hidromel de urze é significativamente diferente do quantificado no hidromel de eucalipto

Em relação ao teor em glicerol, verificou-se um aumento ao longo da fermentação. Para o hidromel de urze obtiveram-se valores finais de 5,83 e 4,77 g/L nas

fermentações levadas a cabo pelas estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23, respetivamente. Os valores determinados no hidromel de eucalipto foram ligeiramente inferiores, 4,95 e 4,76 g/L, respetivamente, para as estirpes LSA ICV D47 e LSA QA23. Não se verificaram diferenças significativas entre as estirpes de leveduras no hidromel de eucalipto. No entanto, para o hidromel de urze verificaram-se diferenças significativas entre elas. Contudo, o teor glicérol quantificado no hidromel de urze apresenta diferenças significativas do hidromel de eucalipto para a estirpe LSA ICV D47. Os nossos resultados estão de acordo com as observações de Pereira (2008), que obtiveram valores para este parâmetro de 3,31 e 5,52 g/L. O glicérol é um dos constituintes mais importantes do vinho, uma vez que melhora a sua qualidade, influenciando a doçura, plenitude e suavidade (Pereira, 2008).

Os valores obtidos para o ácido acético oscilaram entre 0,31g/L para o hidromel de urze produzido pela estirpe LSA QA23 e 0,53 g/L para o hidromel de eucalipto cuja fermentação foi conduzida pela estirpe LSA ICV D47. Estes valores situam-se dentro do limite legal (1,4 g/L) (Regulamento (CE) nº 491/2009) para vinhos brancos e rosés. O teor de ácido acético foi influenciado pela estirpe e pelo tipo de hidromel, verificando-se diferenças significativas entre as leveduras e os hidroméis.

O rendimento em etanol das várias fermentações variou entre os 48,37% no hidromel de eucalipto fermentado pela estirpe LSA QA23 e 53,33% no hidromel de urze produzido pela estirpe LSA ICV D47. Para este parâmetro, nos dois tipos de hidroméis, não se verificaram diferenças significativas entre as duas leveduras, no entanto, os rendimentos obtidos nas fermentações do mosto-mel de urze foi significativamente diferente do hidromel de eucalipto. Os valores mais elevados foram registado no hidromel de urze, tal como era esperado uma vez que houve maior produção de etanol. Resultados idênticos, na produção de hidromel, foram obtidos por Pereira (2008) (mel escuro - 44,70% a 47,32% e mel claro - 47,62% a 47,82%) e Fonseca (2013) (mel escuro - 47,76% a 57,84%).

**Tabela 5:** Resultados do HPLC e rendimento das fermentações

Fermentação	Tempo de fermentação (horas)	Glucose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Rendimento da fermentação (%)
Mosto-mel Urze	0	85,76 ± 0,00	105,10 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00	-
Hidromel Urze LSA ICV D47	120	2,64 ± 0,10b	3,04 ± 0,33b	11,85 ± 0,26c	5,83 ± 1,18b	0,49 ± 0,16b	53,33 ± 1,34b
Hidromel Urze LSA QA23	120	2,62 ± 0,06b	3,78 ± 0,69b	11,33 ± 0,20b	4,77 ± 0,14a	0,31 ± 0,03a	52,88 ± 1,00b
Mosto-mel Eucalipto	0	73,62 ± 0,00	102,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-
Hidromel Eucalipto LSA ICV D47	192	1,89 ± 0,06a	0,09 ± 0,01a	10,37 ± 0,09a	4,95 ± 0,20a	0,53 ± 0,04b	49,68 ± 0,47a
Hidromel Eucalipto LSA QA23	192	2,02 ± 0,08a	0,02 ± 0,03a	10,10 ± 0,12a	4,76 ± 0,22a	0,32 ± 0,06a	48,37 ± 0,75a

As letras (a, b e c) representam que os méis são diferentes pelo teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . Letras iguais representam que não há diferenças significativas.

### **3.3 Produção de vinagre de mel a partir dos diferentes hidroméis produzidos**

Nesta parte do trabalho avaliou-se a produção de vinagre de mel, a partir dos diferentes hidroméis produzidos anteriormente. Para a sua produção foram utilizadas culturas puras de bactérias acéticas.

#### **3.3.1 Caracterização físico-química do produto final**

A fim de avaliar a qualidade final do vinagre produzido quantificaram-se os produtos da fermentação, nomeadamente o etanol, ácido acético e pH. Os resultados obtidos nessas análises encontram-se na tabela 6.

Analisando a tabela 6, podemos observar que em todas as fermentações o etanol foi consumido com produção de ácido acético. O hidromel de urze apresentava um teor de etanol inicial superior ao do hidromel de eucalipto, o que poderá ter contribuído para o aumento da duração da fermentação acética.

No vinagre de hidromel de urze a quantidade residual de etanol foi de 0,68 g/L e de 0,65 g/L quando se utilizou o hidromel produzido pela estirpe LSA ICV D47 e pela LSA QA23, respetivamente. No vinagre de hidromel de eucalipto o etanol residual foi mais reduzido em ambos os hidroméis (0,54 g/L- estirpe LSA ICV D47 e 0,58 g/L - estirpe LSA QA23). Não se verificaram diferenças significativas entre leveduras nem entre hidroméis.

Como era esperado, com o consumo de etanol, houve produção de ácido acético. Para o vinagre de hidromel de urze os valores de ácido acético variaram entre 2,04 g/L e 2,27 g/L dependendo da estirpe utilizada na produção. No vinagre de hidromel de eucalipto os valores obtidos oscilaram entre 2,35 e 2,25 g/L no hidromel produzido pela estirpe LSA ICV D47 e no hidromel produzido pela estirpe LSA QA23, respetivamente.

Os valores de ácido acético ficaram muito abaixo do mínimo estipulado por lei (5 g/mL, para vinagres que não sejam de vinho). Este fato pode ser explicado por termos utilizado culturas puras de bactérias acéticas, em vez de culturas mistas ou inóculos provenientes de algum tipo de vinagre e ainda, por não termos adicionado o hidromel ao longo da fermentação. Outra explicação encontrada para estes resultados tem a ver com a agitação, se for muito elevada, pode levar a volatilização do ácido acético (Ladeiro, 2007). Ilha *et al.* (2000) e Ladeiro (2007) obtiveram teores de ácido

acético, em hidroméis obtidos a partir de méis escuros, na ordem dos 90 g/L e 30 g/L de ácido acético, respetivamente.

Os valores obtidos para o pH dos diferentes vinagres variaram entre 2,92 e 3,02, encontrando-se em concordância com os resultados determinados por outros autores para diversos tipos de vinagres comerciais (White, 1971; Rizzon e Miele, 1998; Pinsirodom *et al.*, 2010). Este parâmetro não foi influenciado pela estirpe nem pelo tipo de hidromel.

**Tabela 6:** Análises físico-químicas do vinagre de mel

Fermentação	Tempo de fermentação (horas)	Etanol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	pH
Vinagre de Hidromel de Urze LSA ICV D47	0	11,94 ± 0,28	0,44 ± 0,02	-
	960	0,68 ± 0,12a	2,04 ± 0,10a	2,97 ± 0,02a
Vinagre de Hidromel de Urze LSA QA23	0	11,31 ± 0,22	0,32 ± 0,05	-
	960	0,65 ± 0,03a	2,27 ± 0,05b	3,02 ± 0,07a
Vinagre de Hidromel de Eucalipto LSA ICV D47	0	10,44 ± 0,22	0,58 ± 0,02	-
	840	0,54 ± 0,04a	2,35 ± 0,05b	2,96 ± 0,02a
Vinagre de Hidromel de Eucalipto LSA QA23	0	10,65 ± 0,07	0,33 ± 0,05	-
	840	0,58 ± 0,04a	2,25 ± 0,04b	2,92 ± 0,04a

As letras (a, b e c) representam que os méis são diferentes pelo teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . Letras iguais representam que não há diferenças significativas.

### 3.4 Determinação de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos totais e para os flavonoides totais estão sumariados na tabela 7.

**Tabela 7:** Resultados dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais do mel, hidromel e vinagre de mel

Amostra	Compostos Fenólicos Totais (mg AG/mL)	Flavonoides totais (mg Q/mL)
Mel Urze	3,14 ± 0,02f	0,28 ± 0,01c
Hidromel Urze LSA ICV D47	2,30 ± 0,13d	0,06 ± 0,00a
Hidromel Urze LSA QA23	2,45 ± 0,03c	0,08 ± 0,00a
Vinagre Urze LSA ICV D47	2,81 ± 0,07e	0,25 ± 0,00b
Vinagre Urze LSA QA23	2,70 ± 0,15e	0,25 ± 0,02b
Mel Eucalipto	2,62 ± 0,05e	0,08 ± 0,02a
Hidromel Eucalipto LSA ICV D47	1,05 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,00a
Hidromel Eucalipto LSA QA23	1,16 ± 0,06ab	0,06 ± 0,00a
Vinagre Eucalipto LSA ICV D47	1,35 ± 0,02b	0,07 ± 0,00a
Vinagre Eucalipto LSA QA23	1,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00a

As letras (a, b, c, d, e e f) representam que as amostras são diferentes pelo teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . Letras iguais representam que não há diferenças significativas.

Da análise da tabela 7 observa-se que o mel de urze (mel escuro) apresentou os valores mais elevados, quer para os compostos fenólicos totais (3,14 mg AG/mL) quer para os flavonoides totais (0,28 mg Q/mL). Seguiu-se o vinagre de urze LSA ICV D47 cujos valores para os compostos fenólicos totais foram de 2,81 mg AG/mL e para os flavonoides totais de 0,25 mg Q/mL.

Estes resultados estão em concordância com os determinados por Estevinho *et al.*, (2012), em mel monofloral de *Erica* sp., utilizando a mesma metodologia. Estevinho *et al.* (2008), já tinha verificado que o mel escuro apresentava um teor de compostos fenólicos e flavonoides totais superior ao do mel claro.

Os hidroméis obtidos a partir do mel de urze apresentaram teores de compostos fenólicos totais mais elevados do que os de eucalipto. De facto, nos hidroméis de urze estes compostos variaram entre 2,30 e 2,45 mg AG/mL e nos de eucalipto entre 1,05 e

1,16 mg AG/mL. Relativamente aos flavonoides totais não se verificaram diferenças significativas entre os vários tipos de hidromel.

Os compostos fenólicos totais oscilaram entre 2,81 e 2,70 mg AG/mL nos vinagres de hidromel de urze e entre 1,35 e 1,04 mg AG/mL nos de eucalipto. Relativamente aos flavonoides o teor foi superior nos vinagres de hidromel de urze.

Verificaram-se diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais entre os vários produtos, obtidos quer a partir do mel de urze quer do de eucalipto.

Relativamente aos flavonoides totais não se verificaram diferenças significativas nos produtos à base de mel de eucalipto. Contudo, nos produtos à base do mel de urze, verificaram-se diferenças significativas entre o mel, hidromel e vinagre de mel. Os teores de flavonoides totais dos produtos à base de mel de urze foram significativamente diferentes dos determinados nos produtos à base de mel de eucalipto. A estirpe não influenciou o teor de flavonoides totais.

Os produtos à base de mel de urze (escuro) foram os que apresentaram teores mais elevados para estes compostos.

Os resultados obtidos para os flavonoides, no vinagre de mel, foram idênticos aos determinados por Pinsiromdom *et al.* (2008) e Verzelloni *et al.* (2010), em vinagres balsâmicos.

De acordo com Küçük *et al.* (2007), a origem floral do mel influencia a concentração e o tipo de substâncias fenólicas presentes e, conseqüentemente as suas propriedades biológicas, incluindo a atividade antioxidante, antimicrobiana e antiviral.



# **CAPÍTULO 4:**

## *Conclusões Finais*

## 4 Conclusões finais

Com a realização do presente trabalho pretendeu-se otimizar a produção de vinagre de mel a partir de hidroméis obtidos de méis de segunda categoria.

Os resultados obtidos permitem-nos tecer as seguintes considerações:

- As fermentações dos mostos-mel de urze e eucalipto tiveram uma duração média de 5 e 8 dias, respetivamente;
- A estirpe de levedura LSA ICV D47 apresentou taxas específicas de crescimento e biomassa final superiores às verificadas para a estirpe LSA QA23;
- Os teores de SO<sub>2</sub> total e acidez volátil foram inferiores para a estirpe LSA QA23, enquanto que a percentagem de etanol foi superior, independentemente do mel usado;
- Para ambas as leveduras, a percentagem de etanol e o glicerol foram mais elevados nas fermentações levadas a cabo no mosto mel de urze;
- A acidez volátil foi idêntica no hidromel de urze e de eucalipto;
- Independentemente do mel utilizado, não houve consumo total dos açúcares nem do azoto;
- O mel de urze foi mais adequado para a produção de hidromel do que o mel de eucalipto;
- A fermentação acética no hidromel de urze terminou ao fim de 960 horas enquanto que no hidromel de eucalipto durou 840 horas;
- A produção de vinagre não foi influenciada de forma significativa pela estirpe de levedura;
- Não se verificaram diferenças relevantes na quantidade de ácido acético nos dois tipos de vinagre;
- O teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foi mais elevado no mel de urze;
- Os produtos à base de mel de urze apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais.

# **CAPÍTULO 5:**

## ***Referências Bibliográficas***

- Acquarone, C., Buere, P., & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, **101**, 695-703.
- Adams, M. R. (1997). Vinegar. Em B. J. Wood (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods* (pp. 1-44).
- Aerny, J. (1985). Définition de la qualité de la vendange. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **17**, 219-223.
- Aerny, J. (1996). Composés azotes des moûts et des vins. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **28**, 161-165.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **3**, 15-23.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **63**, 549-562.
- Aquarone, E., Lima, U. A., Borzani, W., & Schmidell, W. (2001). *Biotecnologia na produção de alimentos* (Vol. 4). São Paulo: Editora Edgard Blücher.
- Aroucha, E. M., Oliveira, A. J., Nunes, G. H., Maracajá, P. B., & Santos, M. C. (2008). Qualidade do mel de abelha produzidos pelos incubados da Iagram e comercializados no município de Mossoró/RN. *Revista Caatinga*, **21**, 211-217.
- Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1648-1656.

- Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, **15**, 1351-1357.
- Ávila, L. D. (2002). Metodologias Analíticas Físico-Químicas - Laboratório de Enologia. *Apostila de Graduação do Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia*. Bento Gonçalves.
- Azeredo, L. C., Azeredo, M. A., Souza, S. R., & Dutra, V. M. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249-254.
- Baltrusaityte, V., Venskutoins, P. R., & Ceksteryte, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, **101**, 502-514.
- Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**, 27,51.
- Berthels, N. J., Cordero-Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, **4**, 683-689.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, **105**, 822-828.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**, 107-119.
- Bogdanov, S. M. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, **28**, 1-59.
- Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 275-282.

- Bortolini, F., Sant`anna, E. S., & Torres, R. C. (2001). compostamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **21**, 236-243.
- Casellas, G. B. (2005). Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. *Dissertação para obtenção de grau de doutor*. Universitat Rovira i Virgili.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coelho, M. S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, **112**, 1022-1030.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M., & Soledad. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4809-4813.
- Cerezo, A. B., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mateo, E., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2008). The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, **109**, 606-615.
- Codex Alimentarius – International Food Standards. (1981). *Codex Standard for honey*, 12.
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., & Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Journal Food Chemistry*, **103**, 1032-1043.
- de Rodríguez, G. O., de Ferrer, B. S., Ferrer, A., & Rodríguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499-502.
- Decreto-lei nº 174/2007 de 8 de Maio. Diário da República Iª Série, nº 88.

Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro. Diário da República Iª Série A, nº 216.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., & Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, **112**, 329-338.

Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas, J. A., & Vázquez-Tato, M. P. (2012). Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 258-254.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chemistry Toxicology*, **46**, 3774-3779.

Evangelista, J. (2001). Microrganismos e enzimas de utilidade na indústria de alimentos. Em *Tecnologia de alimentos* (pp. 245-281). São Paulo: Atheneu.

Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., & Zappalà, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance*, **11**, 49-54.

FAO. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Rome, Italy: FAO Agricultural Services Bulletin.

Ferreira, I. C., Aires, E., Barreira, J. C., & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, **114**, 1438-1443.

Filipe-Ribeiro, L., & Mendes-Faia, A. (2007). Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*, **100**, 1272-1277.

- Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**, 1649-1653.
- Fleet, G. H. (1997). The microbiology of alcoholic beverages. Em *Microbiology of Fermented Foods* (pp. 217-262). Brian J. B. Wood.
- Fonseca, Â. P. (2013). Reutilização de Células Imobilizadas na Produção de Hidromel. *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*.
- Gürbüz, O., Göçmen, D., Dagdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Sahin, I., . . . Usta, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, **100**, 518-525.
- Ilha, E. C., Torres, R. C., Bertoldi, F. C., dos Reis, V. D., & Sant'Anna, E. (2009). Tecnologia de Produção de Vinagre de Mel. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, **86**.
- Iurlina, M. O., & Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 297-304.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E., & del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 698-708.
- Küçük, M., Kolayli, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honey of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526-534.
- Ladeiro, B. C. (2007). Produção de vinagre de hidromel à escala laboratorial. *Relatório final de Curso Licenciatura em Engenharia Biotecnológica*.

- Llaguno, C., & Polo, M. C. (1991). *El Vinagre de Vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, Bucks, **59**, 139-157.
- Maia, M., Russo-Almeida, P., & Pereira, J. (2003). Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, **39**, 19-23.
- Maia, M., Russo-Almeida, P., & Pereira, J. (2005). Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal). *Silva Lusitana*, **13**, 95-103.
- Maldonado, O., Rolz, C., & de Cabrera, S. S. (1975). Wine and vinegar production from tropical fruits. *Journal of Food Science*, **40**, 262-265.
- McConnell, D. S., & Schramm, K. D. (1995). Mead success: Ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring*, **4**, 33-39.
- Mecca, F., Andreotti, R., & Veronelli, L. (1979). L`aceto. *Brescia: AEB*, 433.
- Mendes, C. G., Silva, J. B., Mesquita, L. X., & Maracajá, P. B. (2009). As análises do mel: revisão. *Revista Caatinga*, **22**, 7-14.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., & Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 193-198.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Navrátil, M., Sturdík, E., & Gemeiner, P. (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, **23**, 977-982.

- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, *7*, 159-165.
- Oliveira, J. A., Costa, F. J., Maia, M. d., Santos, A. M., & de Vasconcelos, P. M. (1987). Produção de vinagre de álcool à partir de frutos tropicais excedentes de safra. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, *5*, 33-40.
- Organisation International de la Vigne e du Vin. (1990). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV, Paris.
- Organisation International de la Vigne e du Vin. (2006). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV, Paris.
- Pereira, A. P. (2008). Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel. *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*.
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. M. (2009). Mead production: selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 2057-2063.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead. *Food Science and Technology*, *56*, 21-30.
- Pinsirodom, P., Rungcharoen, J., & Liumminful, A. (2010). Quality of commercial wine vinegars evaluated on the basis of total polyphenol content and antioxidant properties. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, *3*, 389-397.
- Radovic, B. S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., & Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, *72*, 511-520.

- Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A., Dias, T., & Estevinho, L. (2011). Mead production: Tradition versus modernity . *Advances in Food and Nutrition Research*, **63**, 101-118.
- Regulamento (CE) nº 491/2009 de 25 de Maio. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology. Em *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Chichester, England: Jonh Wiley and Sons, Ltd.
- Rizzon, L. A., & Miele, A. (1998). Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos brasileiros. *Brazilian Journal of Food Technology*, **1**, 25-31.
- Roldán, A., van Muiswinkel, G. C., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics,. *Food Chemistry*, **126**, 574-582.
- Russo-Almeida, P., & Paiva, J. (1996). Análise polínica do mel da Terra Quente Transmontana. *O Apicultor*, **13**, 33-42.
- Sachs, L. G. (2001). *Vinagre*. Bandeirantes - Paraná: Fundação Faculdades "Luiz Menghel".
- Schuller, D., & Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, **68**, 292-304.
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, **93**, 73-77.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, **299**, 152-178.

- Sodré, G. d., Marchini, L. C., Moreti, A. C., Otsuk, I. P., & Carvalho, C. A. (2007). Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, **37**, 1139-1144.
- Sroka, P., & Tuszynski, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, **104**, 1250-1257.
- Stefenon, C. A. (2008). O papel do Dióxido de Enxofre (SO<sub>2</sub>) nos vinhos. *Revista Adega*, **31**.
- Suárez-Lepe, J. A., & Íñigo-Leal, B. (2004). *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, **13**, 12-21.
- Ukpabi, U. J. (2006). Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **6**, 37-41.
- Vargas, T. (2006). Avaliação da qualidade do mel produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná. *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologia dos Alimentos*. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., & Conte, A. (2010). Changes in major antioxidant compounds during aging of traditional balsamic vinegar. *Journal of Food Biochemistry*, **34**, 152-171.
- White, J. (1971). Vinegar quality: legal and commercial standards. *Process Biochemistry*, **6**, 21-25.
- Wintersteen, C. L., Andrae, L. M., & Engeseth, N. J. (2005). Effect of Heat Treatment on Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Mead. *Journal of Food Science*, **70**, 119-126.

- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, **37**, 99-105.
- Won, S.-R., Lee, D.-C., Ko, S. H., Kim, J.-W., & Rhee, H.-I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, **41**, 952-956.
- Zancanaro, O. (2001). Vinagres. Em E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell, & U. d. Lima, *Biotechnologia Industrial* (Vol. 4, pp. 183-208). São Paulo: Edgard Blucher Ltda



# CAPÍTULO 6:

*Anexos*

## **6.1 Anexo I: Reagentes utilizados na determinação dos açúcares redutores do mel**

### **➤ Solução de licor de Fehling A**

Dissolver 69,28 g de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada e perfazer o volume até 1 L. Deixar repousar 1 dia antes de usar.

### **➤ Solução de licor de Fehling B**

Dissolver 346 g de tartarato de sódio E potássio e 100 g de hidróxido de sódio em água destilada e perfazer o volume até 1 L.

### **➤ Solução de azul-de-metileno a 0,2%**

Dissolver 2 g de azul-de-metileno em água destilada e diluir até 1 L.

## 6.2 Anexo II: Reagentes utilizados na produção de hidromel

### ➤ Meio YPD sólido

Agar – 20 g

Peptona – 10 g

Extrato de levedura – 5 g

Glucose – 20 g

Água destilada – 1 L

Dissolver os reagentes acima mencionados em 1 L de água destilada, e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

### ➤ DNS

Dissolver 1 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 50 mL de água destilada, à temperatura de 80°C não deixando ferver. Deixar arrefecer a solução anterior e adicionar 20 mL de NaOH a 2N. Juntar 30 g de tartarato de sódio e potássio e perfazer o volume com água destilada até 100 mL.

### ➤ Solução de NaOH a 2N

Dissolver 4 g de NaOH em água destilada e perfazer o volume até 50 mL.

### ➤ Solução de NaOH a 1N

Dissolver 40 g de NaOH em água destilada e perfazer o volume até 1 L.

### ➤ Solução de NaOH a 0,1N

Diluir 100 mL de NaOH a 1N em 900 mL de água destilada.

### ➤ Solução de NaOH a 0,05N

Diluir 500 mL de NaOH a 0,1N em 500 mL de água destilada.

➤ **Azul de bromotimol a 4%**

Dissolver 4 g de azul de bromotimol em 200 mL de álcool. Juntar 200 mL de água destilada sem CO<sub>2</sub> e NaOH 1N até ficar azul. Perfazer até 1 L com água destilada.

➤ **Solução de fenolftaleína a 1%**

Dissolver 1 g de fenolftaleína em 60 mL de álcool e perfazer até 100 mL com água destilada.

➤ **Solução de cozimento de amido a 1%**

Dissolver 1 g de amido em 100 mL de água destilada, ferver e deixar arrefecer.

➤ **Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1/3**

Misturar 1 volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para 2 volumes de água destilada.

➤ **Solução de iodo a 0,02N**

Preparar uma solução de iodo a 0,1N, dissolvendo 2 g de iodeto de potássio em 3-4 mL de água destilada. Pesar 1,27 g de iodo I<sub>2</sub> e transferir para a solução de iodeto de potássio. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

Diluir 50 mL da solução de iodo 0,1N com água destilada para um volume de 250 mL.

### 6.3 Anexo III: Reagentes utilizados na produção de vinagre de mel

#### ➤ **Meio de Frateur sólido**

Extrato de levedura – 10 g

Carbonato de cálcio – 20 g

Etanol – 20 mL

Agar – 20 g

Água destilada – 1 L

Dissolver os reagentes acima mencionados, exceto o etanol, em 1 L de água destilada, e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Deixar arrefecer o meio e adicionar o etanol, com uma seringa estéril. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

#### ➤ **Meio GYC sólido**

Glucose – 3 g

Extrato de levedura – 5 g

Peptona – 5 g

Agar – 15 g

Carbonato de cálcio – 7,5 g

Água destilada – 1 L

Dissolver os reagentes acima mencionados em 1 L de água destilada, e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

#### ➤ **Meio de diferenciação de Carr sólido**

Extrato de levedura – 30 g

Cicloheximida – 50 mg

Verde bromocresol a 2,2% - 1 mL

Agar – 20 g

Etanol – 20 mL

Água destilada – 1 L

Dissolver o extrato de levedura e a cicloheximida em 500 mL de água destilada. À parte, dissolver o agar em 450 mL de água destilada, em banho fervente, agitando frequentemente para evitar o sobreaquecimento. Após dissolução total, adicionar à solução feita anteriormente, homogeneizar e perfazer com água destilada até 1 L e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Deixar arrefecer o meio e adicionar o etanol, com uma seringa estéril. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

➤ **Verde bromocresol a 2,2%**

Dissolver 2,2 g de verde bromocresol em água destilada e perfazer o volume até 100 mL.

➤ **Glicerol a 30%**

Dissolver 30 mL de glicerol em 70 mL de água destilada e autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

➤ **Meio GYC líquido**

Glucose – 3 g

Extrato de levedura – 5 g

Peptona – 5 g

Carbonato de cálcio – 7,5 g

Água destilada – 1 L

Dissolver os reagentes acima mencionados em 1 L de água destilada, e autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

#### **6.4 Anexo IV: Reagentes utilizados na determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais**

➤ **Folin-Ciocalteu a 10%**

Dissolver 10 mL de reagente Folin-Ciocalteu em água desionizada e perfazer o volume até 100 mL.

➤ **Carbonato de sódio a 0,75%**

Dissolver 75 g de carbonato de sódio em água desionizada e perfazer o volume até 1 L.

➤ **Cloreto de Alumínio a 2%**

Dissolver 2 g de cloreto de alumínio em etanol e perfazer o volume até 100 mL.

