

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR**

**ESTUDO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE  
BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DO MEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**NEUCINÉIA VIEIRA CHAGAS**

**GUARAPUAVA-PR**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NEUCINÉIA VIEIRA CHAGAS

# **ESTUDO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DO MEL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 05 de dezembro de 2008.

Prof<sup>o</sup>. Dr. Nilson Evelázio de Souza – UEM

Prof<sup>o</sup>. Dr. Mauricio Rigo – UNICENTRO

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcos Roberto da Rosa

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2008

**NEUCINÉIA VIEIRA CHAGAS**

**ESTUDO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE  
BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DO MEL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2008

DEDICO este trabalho a minha princesa, Roberta Vitória;  
meu marido, José Roberto; minha mãe, Serli Moreira Vieira;  
meu pai, Nevir de Bastos Vieira; minhas irmãs,  
Neudia e Neudicléia ; meu sobrinho, Matheus.

Amo todos vocês,  
Muito obrigada por vocês me apoiarem e confiarem em mim sempre.  
ESTA VITÓRIA É NOSSA!!!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo constante.

Aos Professores Dr. Marcos Roberto da Rosa e Dr. Mauricio Rigo, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo imenso aprendizado durante o trabalho de pesquisa, pela paciência e compreensão, por toda atenção dispensada e por todo conhecimento que transmitiram.

Aos meus pais, por estarem comigo em mais esta importante etapa da minha vida. Vocês são os meus alicerces, agradeço sinceramente por todos os ensinamentos. Sem vocês esta etapa não seria possível. Amo vocês incondicionalmente.

José Roberto, meu amor, você sempre me incentivou durante estes anos, esta força foi e continua sendo muito importante, obrigada pela paciência, compreensão.

A minha princesa Roberta Vitória, você é com certeza a coisa mais bela e importante para mim, obrigada pelos momentos de alegria após horas de dedicação aos estudos você é minha vida. Te amo!

Às minhas irmãs Neudia e Neudicléia pelo incentivo dado.

Ao meu sobrinho Matheus pela ajuda dada ao cuidar da minha princesa para que eu pudesse prosseguir meus estudos.

Aos alunos de iniciação científica Ana Heloisa Reis e João Paulo Niemes pela colaboração com este trabalho e pela disponibilidade em me ajudar.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Yohandra Reyes Torres e a aluna Daiane Finger pela colaboração em realizar as análises de cromatografia e pela disponibilidade em me ajudar.

A Carolina Deisiree Melisio Ferreira por ter auxiliado nas traduções de resumos para artigos e tese

À Chapolin & Schmidt Ltda que forneceu o mel utilizado.

A Reinerth Indústria e Comércio de Bebidas e Conservas Ltda, que forneceu a levedura leofilizada.

Aos amigos de laboratório e pós-graduação por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável, com cooperatividade, respeito e companheirismo.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos por ceder os laboratórios durante a fase experimental.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	2
<b>3. Referencial Teórico</b> .....	3
3.1. Tipos de mel.....	5
3.2. Produção de mel.....	6
3.3. Composição do mel.....	7
3.4. Fermentação do mel.....	10
3.5. Produção de vinhos.....	13
3.6. Estudo Cinético.....	14
3.7. Análise Cromatográficas.....	17
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	20
4.1. Local do experimento.....	20
4.2. Material experimental.....	20
4.2.1 Mel.....	20
4.2.2 Microorganismo.....	21
4.2.3 Medidas de pH .....	21
4.2.4 Teores de açúcares redutores .....	22
4.2.5 Microscopia .....	22
4.2.6 Preparo do Inóculo .....	
4.2.7 Meios de Fermentação .....	
4.2.8 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	
4.2.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	29
5.1. Preparo de uma bebida alcoólica.....	29
5.2. Análises cromatográficas.....	31
5.2.1 Quantificação de açúcares.....	31
5.2.2 Quantificação de 5-HMF.....	32
5.3. Comportamento cinético.....	36
5.4. Análise de sólidos solúveis.....	42
5.5. Comparativo: mel <i>versus</i> glicose.....	44
<b>6. Conclusões</b> .....	47
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	48

## RESUMO

Neucinéia Vieira Chagas. Estudo de parâmetros para produção de bebida fermentada a partir do mel.

Com objetivo de preparar uma bebida fermentada obtida pela transformação dos açúcares do mel em álcool (hidromel) em um tempo reduzido e com aceitação pelo mercado consumidor, foi realizado um estudo da fermentação do mel com *Saccharomyces cerevisiae*. As fermentações foram realizadas com soluções de 16, 20, 21 e 28 grau Brix. Estas soluções foram condicionadas em diferentes condições de temperatura, tempo e meios de fermentação. A análise final foi acompanhada através do °Brix e em seguida confirmada por análises em cromatografia líquida de alta eficiência. As soluções foram submetidas à destilação e o teor de álcool foi determinado com alcoômetro, sendo os melhores resultados quanto à conversão de substrato em etanol para soluções de mel diluído de 16° Brix e 28° Brix. A conversão em massa de glicose em etanol para estas soluções foi igual a 82,74% e 45,95% respectivamente. Verificou-se neste estudo que a fermentação sem o reabastecimento de microorganismo em soluções com teor de açúcares maior, proporciona um menor rendimento de conversão de substrato em etanol. Um estudo cinético foi realizado para comparar a velocidade de fermentação de soluções de mel diluído com diferentes composições e outro utilizando a glicose como única fonte de carbono. Os resultados permitiram a determinação do meio a ser utilizado, verificou-se que o tempo para a fase exponencial da fermentação, é de catorze horas, e o consumo completo de glicose foi determinado após quarenta horas, através de análises cromatográficas verificou-se houve consumo preferencial pela glicose.

**Palavras-chave** : hidromel, mel diluído, fermentação do mel, cinética de fermentação.

## ABSTRACT

Aiming at a fermented beverage, obtained through changes of sugars present in honey into alcohol (wine honey) in a reduced time and acceptable for the consumer market, a study was conducted about the honey fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. The fermentations were carried out with solutions of 16, 20, 21 and 28 Brix Degrees. These solutions were constrained in various conditions of temperature, time and means of fermentation. The final analysis was accompanied by the Brix Degree and then it was confirmed by tests in high performance liquid chromatography. The solutions were subjected to distillation and the alcohol content was determined by alcoholmeter, with the best results on the substrate conversion in ethanol to diluted honey solutions of 16° Brix and 28° Brix. The mass conversion of glucose into ethanol for these solutions was equal to 82.74% and 45.95% respectively. It was verified in this study that the fermentation of microorganisms without refueling in solutions with higher sugar content provides a lower yield of conversion of substrate in ethanol. A kinetic study was conducted to compare the speed of fermentation of diluted honey solutions with different compositions and another using glucose as the only source of carbon. The results allowed the determination of the mean to be used, it was found that the time for the exponential phase of fermentation is fourteen hours, and the complete consumption of glucose was determined after forty hours, through chromatographic analysis it was verified that there was preferential consumption by glucose.

**Keywords:** mead, diluted honey, honey fermentation, kinetics of fermentation.

## INTRODUÇÃO

A apicultura é uma das atividades capazes de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, além de contribuir para manutenção e preservação dos ecossistemas existentes. A cadeia produtiva da apicultura propicia a geração de inúmeros postos de trabalhos, empregos e fluxo de renda, principalmente no ambiente da agricultura familiar, sendo, dessa forma, determinante na melhoria da qualidade de vida.

Atualmente no Brasil a apicultura está deixando de ser artesanal e voltada apenas ao mercado interno, para tornar-se empresarial, tecnificada e produtiva. A profissionalização da atividade ocorreu nos últimos anos. Desde 2001, o Brasil foi descoberto pelos importadores mundiais de mel, devido problemas que acometeram a produção da China, principal produtor mundial e da Argentina, grande produtor e exportador mundial.

Apesar de o Brasil apresentar características especiais de flora e clima que, aliado a presença da abelha africanizada, lhe conferem um potencial fabuloso para a atividade apícola, a apicultura ainda tem muito a se desenvolver no país, e pouco se sabe sobre as propriedades e características de nossos produtos.

A apicultura oferece vários produtos tais como a geléia real, que é o alimento das larvas de todas as abelhas por até 72 horas, excetuando-se a abelha rainha que o recebe por toda vida. A própolis, um vedante da colméia, tem propriedades cicatrizantes. A cera, da qual os favos são feitos, é utilizada em cosméticos e depiladores. E o pólen, que é coletada pelas abelhas, é um fortificante natural. Um produto bem menos conhecido é o hidromel, obtido por meio da fermentação de mel diluído o qual é tido como afrodisíaco, mas há estudos médicos utilizando-o como terapia alternativa à reposição hormonal na menopausa.

Propõe-se neste trabalho avaliar parâmetros que viabilizem a produção desta bebida uma vez que é pouco difundida, e sendo o Estado do Paraná o terceiro produtor de mel na classificação nacional torna-se uma oportunidade para agregar valor a este produto apícola.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Contribuir no desenvolvimento de uma bebida produzida a partir do mel diluído como forma de agregar valor ao mel produzido no Estado do Paraná.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estudo cinético da fermentação do mel utilizando levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*;
- Preparação de bebidas fermentadas com diferentes teores de álcool e açúcar;
- Agregar valor a um produto apícola da região de Guarapuava;

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil, as indústrias de açúcar e álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. Estima-se que a produção de álcool iniciou-se na Capitania de São Vicente, porque nela foi montado o primeiro engenho de açúcar do País. Isso ocorreu após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar trazidas da ilha da Madeira, em 1532. Certamente, transformava-se o melaço residual da fabricação do açúcar em cachaça e, diretamente da garapa fermentada, produzia-se aguardente. Por séculos, as bebidas destiladas foram à única forma de produção do álcool. O álcool industrial foi desenvolvido na Europa, nos meados do século XX. No do século XX iniciou-se a produção de etanol no Brasil, com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava sua capacidade produtiva <sup>[01; 02]</sup>.

A Alemanha e, principalmente a França, deram grande contribuição ao desenvolvimento das técnicas de fermentação alcoólica, de destilação e de construção de equipamentos de destilação. Utilizava-se o etanol para fins farmacêuticos, para a produção de alguns produtos químicos derivados, para bebidas, e como fonte de energia térmica por combustão, em algumas atividades <sup>[03]</sup>.

O etanol é obtido através da síntese e da fermentação. Pela síntese obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o etileno e o acetileno, e de gases de petróleo e da hulha. Nos países em que há grandes reservas de petróleo e uma indústria petroquímica avançada, é uma forma econômica de produzir álcool <sup>[02; 04]</sup>. A fermentação, é a maneira mais utilizada para obtenção do álcool etílico no Brasil. Mesmo que haja disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool pela síntese, a fermentação ainda será de grande importância para a produção de álcool sob a forma de aguardentes. As bebidas fermento-destiladas possuem características próprias de aroma e sabor, conferidas por impurezas decorrentes do processo fermentativo <sup>[02]</sup>.

Entretanto, para que seja viável economicamente é preciso considerar o volume total de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. Outro fator considerável é devido a produção de etanol atualmente praticado no Brasil envolver o reciclo das leveduras, e com isso ocorre o reciclo de contaminantes causando diversos distúrbios tais como : consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade das células de levedura devido a toxinas lançadas no meio pelos contaminantes, fermentações secundárias oriundas da

atividade desses microorganismos contaminantes, além do problema de floculação das células de levedura provocada tanto por bactérias como por leveduras <sup>[05]</sup>.

Um dos grandes fatores que torna a produção de etanol, por fermentação, a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o País <sup>[06]</sup>.

Qualquer produto que contenha açúcar, ou outro carboidrato, constitui-se em matéria-prima para a obtenção de etanol.

Há várias maneiras de classificar as matérias-primas para a produção de etanol, mas quaisquer critérios adotados têm fatores positivos e negativos. Podemos classificá-las em: matérias açucaradas (agrupando cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas), matérias amiláceas e feculentas (agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos) e matérias celulósicas (incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel) <sup>[02]</sup>.

Durante toda a história, ao redor do mundo, as sociedades humanas descobriram como fazer bebidas fermentadas, utilizando fontes de açúcar disponíveis. Análises químicas de compostos orgânicos absorvidos em frascos de cerâmica da província de Henan, na China, revelaram que uma mistura fermentada de arroz, mel e frutas já era produzida sete milênios antes de Cristo <sup>[03]</sup>.

Nos tempos pré-industriais, o mel era a principal fonte de açúcares na dieta de muitos povos. O mel é uma fonte original de açúcares simples, como a glicose e a frutose (60-80% do seu peso). No Brasil um aspecto favorável é o seu clima estável e temperatura quente. Isso ajuda muito, pois a abelha é sensível ao frio. Essa sensibilidade a temperaturas baixas é o grande problema das abelhas européias <sup>[07]</sup>.

O mel pode ser utilizado para a obtenção de diversos produtos, entre eles o vinagre de mel e o vinho de mel (conhecido como hidromel).

Outros produtos provenientes da atividade apícola incluem a cera de abelha, que é usada para confecção de velas, sabões e produtos de beleza, a própolis e a geléia real, muito utilizadas na medicina e o veneno (apitoxina) tem sido muito estudado e usado para finalidades terapêuticas, principalmente na Europa e Rússia <sup>[07]</sup>.

O mel de abelhas sempre foi considerado um alimento energético, digestivo, tonificante dos músculos, tonificante do sistema nervoso central e medicamento natural <sup>[08]</sup>.

Uma das características intrínsecas do mel é sua propriedade antimicrobiana, através

da qual pode se manter imune à deterioração por longos períodos de tempo, o que já era constatada desde a antiguidade, entre os povos hindus, egípcios, gregos e chineses que utilizavam o mel como medicamento <sup>[06]</sup>. O mel é útil também no tratamento de dispepsias, úlceras gástricas e duodenais e várias doenças gastrointestinais, com ação anti-inflamatória e atividade antioxidante <sup>[09]</sup>.

No mel não diluído, a acidez também é significativo fator antimicrobiano. O pH variando de 3,2 a 4,5 é baixo suficiente para inibir o desenvolvimento de patógenos, cujos valores de pH ótimos variam entre 7,2 e 7,4. No entanto, a maior atividade antimicrobiana do mel é devida ao peróxido de hidrogênio produzido enzimaticamente <sup>[10]</sup>.

### 3.1. Tipos de mel

O mel floral é um produto elaborado pelas abelhas a partir do néctar coletado das flores. A composição do néctar pode variar em função das características da flora da região, bem como das condições climáticas. Alguns tipos podem apresentar predominância de sacarose <sup>[08;11]</sup>.

O mel floral pode ser monofloral, quando o néctar é coletado de uma única espécie vegetal; polifloral, se mais de uma espécie de planta contribui com o néctar; silvestre, que se caracteriza por ser um mel polifloral produzido em vegetação primária e, portanto, espécies nativas contribuem com o néctar. O mel extrafloral não é produzido a partir do néctar e, sim de exsudato de plantas ou restos de frutas ou de outra fonte de matéria-prima <sup>[11]</sup>.

Todo país possuiu um mel que se destaca dentre eles a Argentina tem mel de maçã, os E.U.A tem mel de laranja. A França orgulha-se de possuir o célebre mel de gattinais, colhido do sanfeno. A Espanha tinha uma plantinha miúda, o tomilho, que dava um mel muito saboroso. Os alemães orgulhavam-se de seu famoso mel da floresta negra, de onde veio também o relógio-cuco <sup>[12]</sup>.

Existem diversos tipos de méis no mundo, o mais famoso mel do mundo antigo, cantado pelos poetas como manjar dos deuses, era colhido pelas abelhas da África, nas montanhas do Hymeto, na Grécia, a 1.027 metros de altura, a Sudoeste de Atenas. As plantas que destilavam o famoso néctar deviam ser da família das labiadas hoje extintas <sup>[13]</sup>.

Os méis hoje obtidos pelo mundo, são produzidos principalmente pelas abelhas do gênero *Apis* : *Apis mellifera* (Europa, África e Oriente Médio), *Apis cerana* (a abelha de

colméia, nativa do sul da Ásia), *Apis dorsata* e *Apis florea* (que têm como ninho um favo único ao ar livre, nativas dos trópicos da Ásia). Mas há outras espécies que produzem tipos diferentes de mel, como as abelhas sem ferrão (meliponídeos, nos trópicos de todos os continentes), que somam cerca de 500 espécies ao todo. Há também espécies de vespas na América do Sul tropical e formigas em algumas áreas secas da Austrália e América do Norte que produzem mel, mas não produzem cera <sup>[14]</sup>.

A apicultura brasileira teve início com enxames trazidos pelos imigrantes, com a colonização, contudo, somente com a introdução de abelhas africanas, em meados de 1956, é que se deu a revolução da apicultura no Brasil com o cruzamento das duas populações, produzindo um híbrido conhecido hoje por abelhas africanizadas <sup>[15]</sup>.

### **3.2. Produção de mel**

Pesquisa mostrou que em 2003, a China foi o maior produtor mundial de mel com duzentos e setenta e cinco mil toneladas, seguida de Estados Unidos, Argentina e Turquia <sup>[16]</sup>.

Segundo o IBGE, a produção nacional de mel, em 2002, atingiu 23.995 toneladas. O Paraná com uma produção de 2.844 toneladas, coloca-se em terceiro lugar, antecedido por Santa Catarina, com 3.829 toneladas e o Rio Grande do Sul, com 5.605 toneladas <sup>[17; 18]</sup>.

Estas mesmas fontes trazem que a produção brasileira de mel, de 2003 foi de 30.002 toneladas, ficando o Estado do Paraná com 4.068, em terceiro lugar na classificação nacional da produção de mel <sup>[18]</sup>. Conforme apresentado na tabela 1, a Diretora de Pesquisa do IBGE traz os principais municípios produtores de mel de abelha, ênfase deve ser dada ao oitavo lugar desta tabela, sendo Prudentópolis um importante fornecedor de mel para o presente trabalho, hoje também conhecida como “Capital do Mel” <sup>[18]</sup>.

Em 2004 o Brasil exportou 21.028 toneladas de mel, aproximadamente duas vezes mais do que em 2002. O Estado do Paraná como mostra a tabela 2, em 2004 exportou 1.735.044 kg de mel, destacou-se na classificação de exportação em quinto lugar, antecedido pelo Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo <sup>[17; 18]</sup>.

**Tabela 1** – Principais municípios produtores de mel de abelha

Município	Unidade da Federação	Quantidade (kg)
Içara	Santa Catarina	600.000
Picos	Piauí	509.197
Limoeiro do Norte	Ceará	450.000
Dom Pedrito	Rio Grande do Sul	350.000
Ortigueira	Paraná	304.000
São João do Triunfo	Paraná	280.000
Santana do Livramento	Rio Grande do Sul	280.000
Prudentópolis	Paraná	275.000
Cambará do Sul	Rio Grande do Sul	252.000
Ribeira do Pombal	Bahia	240.000

Fonte : IBGE, Diretoria de Pesquisa, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2003 <sup>[18]</sup>.

O Paraná dispõe de variada vegetação natural e cultivada, de boa qualidade floral e melífera, propícia para o desenvolvimento da apicultura como fonte de renda do produtor rural <sup>[14]</sup>.

**Tabela 2** – Exportação de mel no Paraná e Brasil, 2002 a 2004.

Ano	Paraná		Brasil	
	kg	Preço Médio (U\$/kg)	kg	Preço Médio (U\$/kg)
2002	848.659	1,98	12.640.487	1,83
2003	1.911.613	2,4	19.273.148	2,36
2004	1.735.044	2,25	21.028.468	2,02

Fonte : MDIC/SECEX (Sistema Aliceweb – mai/05) <sup>[18]</sup>.

A excelente qualidade do mel brasileiro contribui para tornar o Brasil, país emergente no seleto mercado mundial <sup>[17; 18]</sup>.

### 3.3. Composição do mel

O mel contém uma mistura complexa de carboidratos, aminoácidos, ácidos, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, cera e grãos de pólen. Ao todo, já foram encontradas mais de 180 substâncias em diferentes tipos de mel <sup>[09; 19; 20]</sup>. Sua composição, cor, aroma e sabor podem ser bastante variados, dependendo principalmente das floradas, das

regiões geográficas e das condições climáticas <sup>[14]</sup>.

Na tabela 3 está apresentada a composição típica do mel, estes valores podem diferenciar bastante de uma região para outra, principalmente se as condições climáticas e a flora forem muito diferentes.

**Tabela 3** – Composição típica do mel

	Média	Faixa de variação	Desvio padrão
Taxa frutose/glicose	1,23	0,76 – 1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 – 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 – 40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020 – 1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 – 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 – 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 – 6,10	- - -
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68 – 59,49	10,33
Proteína (mg/100g)	168,6	57,7 – 567	70,9

Fonte : NATIONAL HONEY BOARD, 2003 <sup>[21]</sup>.

Os valores citados na tabela 3 foram também obtidos por Marchini; Moreti e Otsuk (2005)<sup>[7]</sup> para proteínas, pH, acidez, minerais, açúcares redutores em méis produzidos por *Apis mellifera L.* no Estado de São Paulo. Méis do Paraná, Pernambuco, São Paulo e Santa Catarina analisados por Stonoga e Freitas (1991) <sup>[22]</sup> apresentaram relações frutose/glicose semelhantes ao da tabela 3.

A fração monossacídica do mel é composta basicamente de frutose e glicose, numa proporção que varia de 27,5 a 40 % para glicose e de 36,2 % a 49,59 % para frutose, de acordo com a época da florada. Já os méis de melato apresentaram concentrações baixas de frutose e glicose, apresentando cerca de 34% e 26% respectivamente <sup>[11]</sup>.

A glicose é responsável pela cristalização do mel, cuja tendência pode ser estimada pela relação glicose/água (G/A). O maior problema relacionado com a cristalização é o aumento da atividade de água, que permite o desenvolvimento das células de leveduras osmofílicas (presentes naturalmente no mel) e a fermentação do produto, com aumento da acidez. A glicose pode ainda fornecer acidez ao mel pela ação da enzima glucose-oxidase, com a formação de ácido glucônico, que constitui 70 a 90% dos ácidos orgânicos do mel. Pela ação desta enzima se obtém também peróxido de hidrogênio. Além da frutose e da glicose, a presença de D-galactose, em quantidades traços, também já foi relatada em amostras de mel.

Porém, na sua forma livre, este monossacarídeo é considerado um composto tóxico para as abelhas <sup>[11]</sup>.

Além da sacarose, diversos outros di e trissacarídeos são descritos na literatura como constituintes do mel, o dissacarídeo em maior presença é a maltose cujos teores podem variar de 1% a 16% dependendo da florada e da região de origem <sup>[11]</sup>.

De acordo com relatos de Vargas (2006) <sup>[14]</sup> o teor de sacarose em geral não ultrapassa 8%, sendo que uma taxa elevada pode indicar uma colheita prematura do mel, isto é, um produto em que a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase <sup>[14]</sup>.

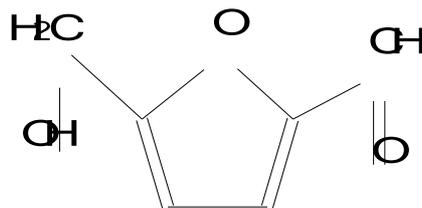
As enzimas presentes em maiores quantidades no mel são a invertase, a amilase (diastase) e a glucose-oxidase, produzidas nas glândulas hipofaríngeas das abelhas e adicionadas ao néctar na vesícula melífera, enquanto a abelha transporta o néctar ou melato para a colméia. A diastase é a enzima que hidrolisa o amido. Não desempenha nenhum papel significativamente na produção de mel, mas sua presença é indicativo de qualidade. A glucose-oxidase, em soluções diluídas, reage com a glicose formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, capaz de proteger o mel da decomposição bacteriana. Um sistema similar de produção de peróxido de hidrogênio parece estar em todas as abelhas que estocam mel em favos (as quatro espécies de abelhas *Apis*, as mamangavas que formam colônias e as abelhas ferrão) <sup>[21]</sup>.

Os ácidos orgânicos compreendem uma pequena porção no mel (cerca de 0,5%) e a acidez total pode ser um indicador de fermentação. Incluem o ácido acético, butírico, cítrico, fórmico, láctico, málico, piroglutânico, succínico <sup>[21]</sup>.

O mel possui menos de 0,3% de aminoácidos, sendo prolina o mais abundante. <sup>[21]</sup>.

O mel contém naturalmente pequenas frações de hidroximetilfurfural (HMF), mas seu nível elevado é um indicativo de superaquecimento, longa estocagem ou falsificação <sup>[14]</sup>.

O HMF (figura 1) é um produto da desidratação de hexoses em condições ácidas, numa velocidade que varia diretamente com a temperatura. A formação de HMF é bastante variável dependendo de características químicas do mel e das condições do meio, tais como tempo de armazenamento, pH, acidez e a temperatura a que foi submetido <sup>[14]</sup>.



**Figura 1:** Estrutura do HMF <sup>[14]</sup>

A toxicidade do 5-hidroximetil-furfural em seres humanos ainda não é bem conhecida, com exceção do furfural, para o qual já está estabelecido o valor IDLH ("Immediately Dangerous to Life or Health Air Concentration") que é de 100,00 ppm. A literatura sugere que o contato prolongado ou repetitivo com o furfural possa causar dermatites, irritação da mucosa e trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central. Todos esses dados são baseados em testes realizados com animais de laboratório, não havendo estudos conclusivos sobre os efeitos desses aldeídos sobre humanos <sup>[23]</sup>.

Tanto o furfural como o 5-hidroximetil-furfural podem ser considerados indicadores de degradação de bebidas, quando encontrados em grandes concentrações. No mel, por exemplo, o aumento do conteúdo de HMF é associado ao tratamento térmico severo ou à temperatura inadequada de estocagem <sup>[23]</sup>.

O aumento da concentração do HMF está relacionado com reações que promovem mudanças na cor, principalmente naqueles alimentos que sofrem reação de Maillard ou caramelização. Entretanto, quando presentes em baixas concentrações, compõem o aroma de algumas bebidas como brandies (conhaques) e vinhos envelhecidos em barris de madeira <sup>[23]</sup>.

### 3.4. Fermentação do mel

Hidromel é a bebida produzida utilizando-se como matéria-prima o mel. É obtida pela transformação dos açúcares do mel em álcool, contendo de 8 a 18% (v/v) de etanol por um processo de fermentação similar ao do vinho. Ao longo da história, ele sempre esteve presente em países que não apresentavam condições para o cultivo da vinha, permanecendo esquecido nas regiões produtoras de uva. Somente nas regiões mais frias do Norte da Europa esta bebida continuou a ser consumida <sup>[24]</sup>.

Segundo Amorim, Basso e Alves (1996) <sup>[25]</sup>, a levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia

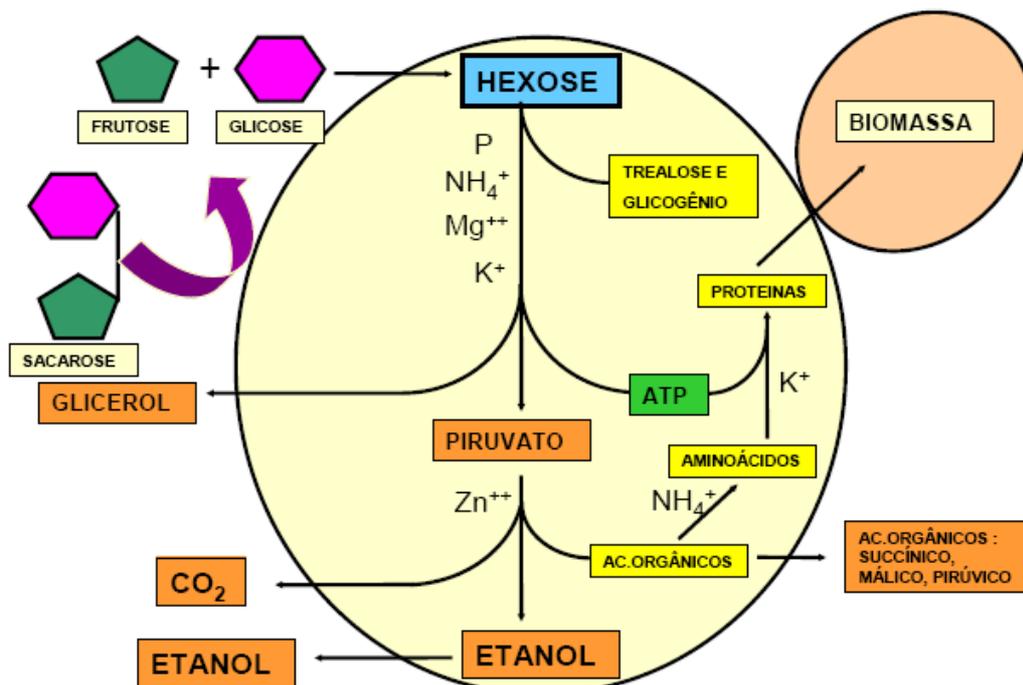
química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um substrato desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições na produção de etanol. As células de leveduras possuem compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria [26].

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por brotamento, onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula [25].

A fermentação alcoólica, o mais importante na fabricação do hidromel, compreende um conjunto de reações enzimáticas controladas, através das quais, uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples liberando energia. O primeiro, denominado glicólise, tem início com a ativação da glicose, que recebe, em reações sucessivas, dois fosfatos energéticos, provenientes de duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato), que se transforma em ADP (adenosina difosfato) [25].

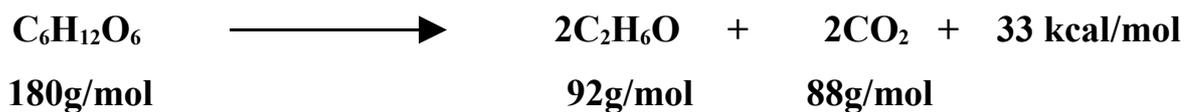
A glicose, por sua vez, se transforma em gliceraldeído 1,3-difosfato. Ao final, cada gliceraldeído é transformado em ácido pirúvico. O rendimento é de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada conforme a figura 2 [26].

Obviamente, não se consegue manter um processo de fermentação alcoólica obtendo-se 100% de rendimento, pois as células têm de proliferar, o que significa a síntese de muitos outros compostos intermediários, sendo o acúmulo de etanol a via metabólica que permite a geração de energia na forma de ATP (glicólise). Claro está que esse é um ponto fundamental, pois a matéria-prima incide em algo como 60% do custo do etanol e, desta forma, baixos rendimentos tornariam inviável a produção deste produto de baixo valor agregado [30].



**Figura 2:** Demonstração do processo inicial de fermentação alcoólica com ativação da glicose<sup>[27]</sup>

A estequiometria da transformação de açúcares redutores totais em etanol e CO<sub>2</sub> foram representadas pela equação de GAY-LUSSAC:



**Equação 1 :** Estequiometria da reação

A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 gramas) produz 2 moles de etanol (92 gramas), 2 moles de dióxido de carbono (88 gramas) e 33 kcal de energia.

O rendimento teórico de conversão de glicose em gás carbônico é igual a 0,49, enquanto o rendimento teórico de conversão de glicose em etanol é de 0,51.

A massa de CO<sub>2</sub> liberada em frascos de fermentação, em batelada, pode ser convertida em massa de etanol presente no meio multiplicando-o pela razão 0,51/0,49<sup>[28]</sup>.

Desta forma o rendimento de fermentação pode ser acompanhado, diretamente pela

formação de etanol, quanto perda de massa, devido à eliminação de dióxido de carbono.

Na prática este valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para produção de glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura <sup>[03]</sup>.

### **3.5. Produção de vinhos**

Segundo a legislação brasileira, os vinhos são divididos, quanto à classe em vinho de mesa (teor alcoólico de 10 a 13°GL), vinho champanha (teor alcoólico de 10 a 13°GL), espumante (teor alcoólico de 7 e 10°GL), espumante gaseificado (teor alcoólico de 10 a 12°GL) e licoroso (teor alcoólico entre 14 a 18°GL), podendo ser tintos, rosados, ou brancos em cada caso. A Legislação estabelece ainda que para os vinhos de frutas, a graduação alcoólica esteja entre 10 e 14°GL. A adição de sacarose poderá ser, no máximo, igual à dos açúcares da fruta <sup>[26]</sup>.

O vinho produzido de mel não é tão popular a ponto de ser consumido pelo público em geral. É um produto de demorada produção, ao tentar otimizar o tempo de produção alguns obstáculos decorrentes entre outras coisas, do sabor amargo, das turvações e precipitações podem ocorrer durante o armazenamento. Estudos visando futuramente diminuir o tempo de fermentação que é de semanas estão em andamento <sup>[29]</sup>.

A fabricação de uma bebida alcoólica a partir da fermentação do mel deve produzir um vinho de sabor agradável, com teor alcoólico variando de 12 a 14% de álcool <sup>[29]</sup>.

Vinhos obtidos por processo de baixa fermentação, na temperatura de 15 a 18°C é causa de muitos sabores desagradáveis.

Vários fatores podem influenciar na fermentação do mel diluído, dentre os fatores químicos estão a carência de nutrientes e a presença de inibidores. Sendo necessária a adição de vários nutrientes tais como : ácido cítrico para evitar a manutenção de microorganismos. Um metabolismo mais eficiente é conseguido com a adição de  $K_3PO_4$ ,  $MgCl_2$  e  $NaHSO_4$  produzindo um meio favorável para fermentação. Sulfato de amônio, peptona e fosfato de potássio poderão ser utilizados para melhorar o desempenho da fermentação, enquanto a tiamina, pantotenato de cálcio, inositol, pirodoxina e biotina são vitaminas necessárias para ação do processo metabólico <sup>[29]</sup>.

Os fatores fisico-químicos que influenciam a fermentação são : aeramento,

temperatura, clarificação do mosto e agentes microbianos <sup>[09;19]</sup>.

### **3.6. Estudo cinético**

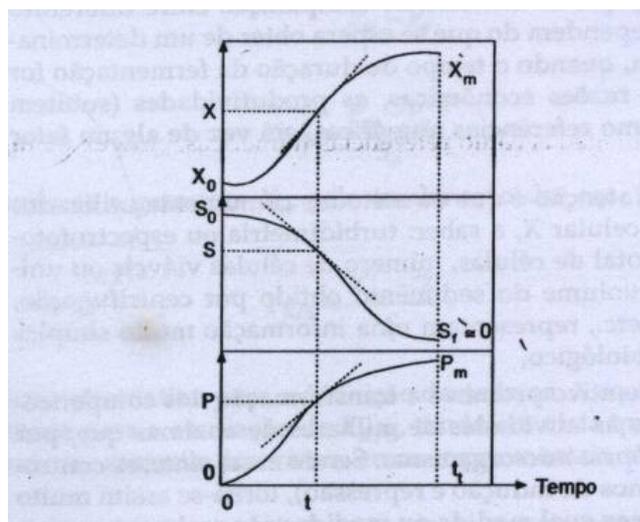
O estudo da cinética de processos fermentativos tem como propósitos :

- medir a velocidade de transformação que ocorre durante uma fermentação;
- estudar a influência dos fatores nestas velocidades (pH, temperatura do meio de cultura);
- correlacionar por meio de equações empíricas, ou módulos matemáticos, as velocidades com os fatores que nelas influem <sup>[03]</sup>;

A análise cinética de uma reação é o estabelecimento da estequiometria da reação e a identificação de reações laterais. A idéia básica perseguida pela cinética química é a de determinar, em função do tempo de reação, as concentrações de reagentes e produtos. As velocidades das reações dependem, em geral, da temperatura, e por isso, nas experiências comuns de cinética, se mantém constante a temperatura do sistema reacional <sup>[30]</sup>

O método adotado para acompanhar as mudanças de concentrações depende das espécies químicas envolvidas e da rapidez das alterações. Muitas reações atingem o equilíbrio em minutos ou horas, e é possível aproveitar várias técnicas para acompanhar as mudanças de concentração da solução <sup>[30]</sup>.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste, inicialmente, na análise da evolução dos valores das concentrações de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes, o microorganismo (ou biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura <sup>[31]</sup>.



**Figura 3** : Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação. X, P e S são as concentrações do microorganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente. Fonte: (BORZANI, 2001)<sup>[31]</sup>.

Os valores experimentais de concentração (X, P e S respectivamente), quando representados em função do tempo, permitirá os traçados da curva de ajuste, como na figura 3 e poderá ser expressa como :

$$\begin{aligned}
 X &= X(t) \\
 P &= P(t) \\
 S &= S(t)
 \end{aligned}$$

Quando as conclusões sobre um cultivo forem baseadas, unicamente, em dois valores de X, S ou P (como é comum, por exemplo, sobre valores finais e iniciais), não se pode afirmar que um estudo cinético do processo tenha sido realizado; é necessário, outrossim, o conhecimento dos valores intermediários, que permitam definir os perfis das curvas ou a forma matemática destas, para uma análise adequada do fenômeno sob o ponto de vista cinético<sup>[31]</sup>.

Assim tais perfis representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação como, por exemplo, a identificação da duração do processo, geralmente baseada no instante em que X e P apresentam valores máximos ( $X_m$  e  $P_m$ , na figura 3).

Uma vez que esses valores representam parte de um conjunto de dados necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial <sup>[31]</sup>.

A cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis, como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão.

Afirmar que um determinado valor de pH, por exemplo, é melhor que outro, equivale dizer que o fator de conversão (substrato em produto, por exemplo) é maior no primeiro que no segundo caso. O mesmo pode ser afirmado quando se comparam os desempenhos de cultivos sob diferentes temperaturas, diferentes variedades de uma dada espécie de microorganismo, diferentes composições do meio, etc.

Neste trabalho foi realizado o estudo cinético de fermentação do mel diluído em diferentes meios, conjuntos de frascos contendo o meio nutriente e a solução de mel diluído foram preparados e submetidos à pesagem durante a fermentação em intervalos de tempo de uma hora, obtendo-se a massa de dióxido de carbono (P) evoluída em função do tempo.

Dentre os produtos formados, escolhe-se para o estudo cinético, o produto de interesse econômico, no estudo cinético desenvolvido no trabalho acompanhou-se o desenvolvimento de dióxido de carbono em função do tempo. Neste caso a velocidade instantânea de formação ( $v_p$ ) de dióxido de carbono um dos produtos da fermentação da solução diluída de mel, poderá ser traduzida pela equação 2, para um tempo  $t$  :

$$v_p = \frac{dP}{dt}$$

**Equação 2 :** Curvas de ajuste dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação.

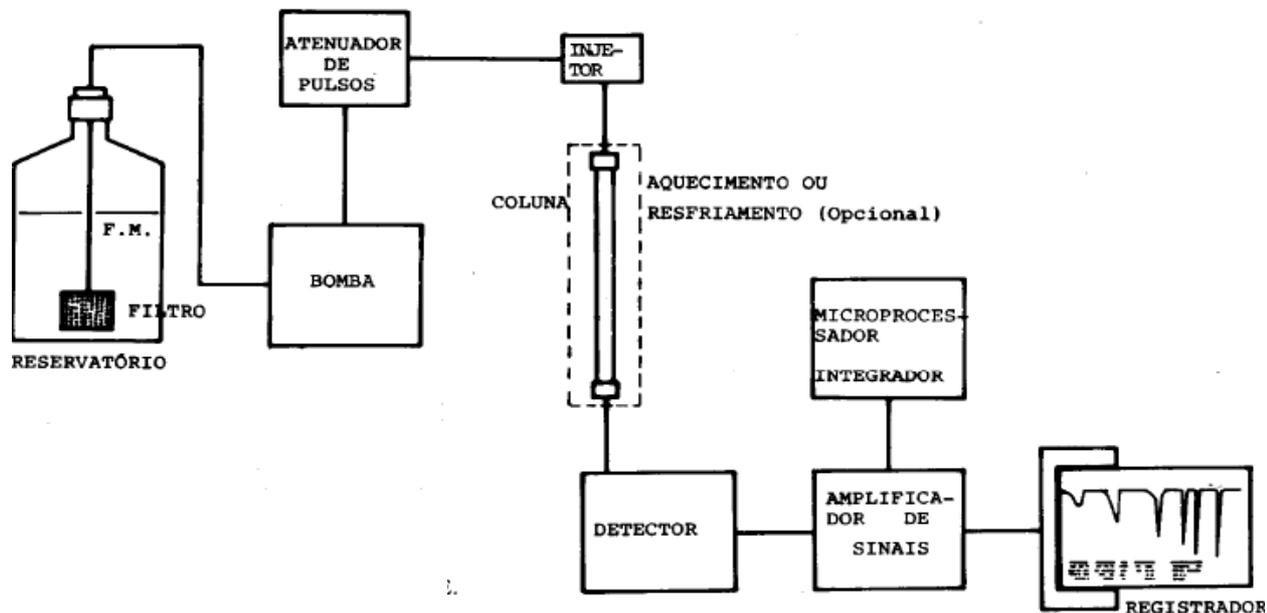
A projeção gráfica do  $\ln$  da massa obtida, em função do tempo fornece dados suficientes para que através da inclinação da reta seja possível estimar a constante de velocidade de formação de produto <sup>[31]</sup>.

### 3.7. Análise cromatográfica

Após a obtenção do produto desejado e dos dados cinéticos determinados foi realizada a verificação de açúcares residuais das amostras, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para confirmação dos resultados em amostras pré-determinadas.

A cromatografia de alta eficiência permite realizar a separação e quantificação de compostos orgânicos de um modo rápido, eficiente e em condições analíticas suaves. A cromatografia líquida complementa a cromatografia gasosa por ser aplicável à análise de compostos orgânicos termicamente instáveis ou de peso molecular elevado, que não podem ser determinados pela cromatografia gasosa [06; 32].

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o mais novo e importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. A CLAE utiliza instrumentos com um intervalo maior de resolução por menor tempo e operação totalmente automatizada. O Instrumental da CLAE consiste de reservatórios da fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna de separação e um detector, conforme diagrama disposto na figura 4.



**Figura 4 :** Esquema do sistema de cromatografia líquida de alta-eficiência (HPLC)<sup>[33]</sup>

A bomba deve fornecer um fluxo constante e pré-determinado do eluente, podendo a sua composição relativa variar no tempo (fase móvel). Se a composição da fase móvel for constante no decorrer da análise, falamos em modo isocrático, por outro lado se variar ao

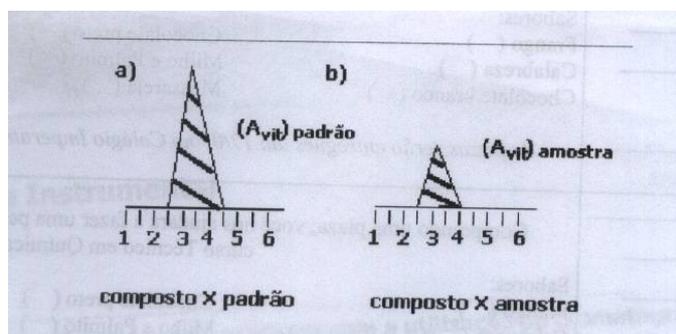
longo do tempo, falamos em modo de gradiente. No injetor a amostra é adicionada ao eluente e em seguida introduzida na coluna onde se vai realizar a separação dos seus componentes. Estes, após serem separados e eluídos da coluna, passam por um detector, que com base numa propriedade física os converte num sinal elétrico proporcional à sua concentração na amostra.

Este sinal por sua vez é registrado pelo registrador/integrador<sup>[06]</sup>.

Quando se pretende quantificar o conteúdo de um composto numa amostra, torna-se necessário realizar a calibração do sistema analítico. Para isso utiliza-se uma amostra padrão na qual seja rigorosamente conhecida a concentração de cada um dos componentes. O requisito de utilização de um padrão externo deve-se ao fato do injetor que utiliza neste tipo de cromatografia ser muito preciso e reprodutível (as quantidades a injetar variam de 5 a 50 $\mu$ l)  
[34; 35]

Pela injeção do padrão externo obtém-se informação qualitativa – o tempo que demora a sair determinado componente (pico) após a injeção e quantitativa – a área de cada um dos picos, que é proporcional à quantidade de cada componente. Com base em padrões, é fácil calcular um fator de resposta (RF) do sistema analítico a cada um dos componentes (nas condições experimentais específicas dos sistema). Determinados os fatores de resposta do sistema analítico aos componentes, proceder-se-á à injeção da amostra, utilizando rigorosamente o mesmo procedimento efetuado na determinação dos valores de RF. Por comparação com o padrão determina-se o conteúdo de açúcares em amostras de concentração desconhecida [34; 35].

Durante a realização experimental o volume a analisar de amostras é constante, seja o cromatograma representado em a), resultante da injeção de um padrão externo do composto X (que contenha 4mg de X).  $A_x$  é a área do pico correspondente ao composto X no padrão externo.



O quociente de  $[X] / A_x$  é igual a uma constante, que designar-se-á a partir daqui por RF :

$$[X] / A_x = \text{RF}$$

Considera-se agora o cromatograma apresentado em **b)**, representativo da injeção de uma amostra de concentração de X na amostra é :

$$[X]_{\text{amostra}} = (A_x)_{\text{amostra}} \times \text{RF}$$

Todas as análises quantitativas devem ser realizadas geralmente em triplicata, quer do padrão quer da amostra a analisar.

Os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. A análise desses açúcares é uma atividade rotineira nos laboratórios das indústrias alimentícias <sup>[36]</sup>.

Para se estimar o teor de açúcares redutores e açúcares em alimentos, existem vários métodos químicos que fornecem elevado grau de confiabilidade. Um método muito seletivo tem sido utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência, que identifica uma variedade de carboidratos na amostra, por ser mais sensível além de possuir um tempo de análise pequeno <sup>[24]</sup>.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

A parte experimental foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Curso de Engenharia de Alimentos - Campus Unicentro / Cedeteg e Laboratório de Química Orgânica.

### 4.2 Material experimental

#### 4.2.1 Mel

O mel utilizado foi doado pela empresa Chapolin & Schmidt Ltda (figura 4), localizado na região de Prudentópolis – PR. Este é comercializado com o nome de *Mel Kalena*, contendo as informações nutricionais descritas na tabela 4. Após a aquisição dos méis, estes foram estocados em local seco a temperatura de 25-30°C.

**Tabela 4** – Informações nutricionais obtidas do *Mel Kalena*, fornecido pela empresa Chapolin & Schmidt Ltda.

Fonte : Chapolin & Schmidt Ltda

<b>Informação Nutricional</b>		
Porção de 20 mL		
	Quantidade por porção	% VD(*)
Valor calórico	90 kcal	4%
Carboidratos	23 g	6%
Proteínas	0 g	0%
Gorduras totais	0 g	0%
Gorduras Trans	0 g	0%
Sólido	0 mg	0%
VD(*) – Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2500 calorias.		

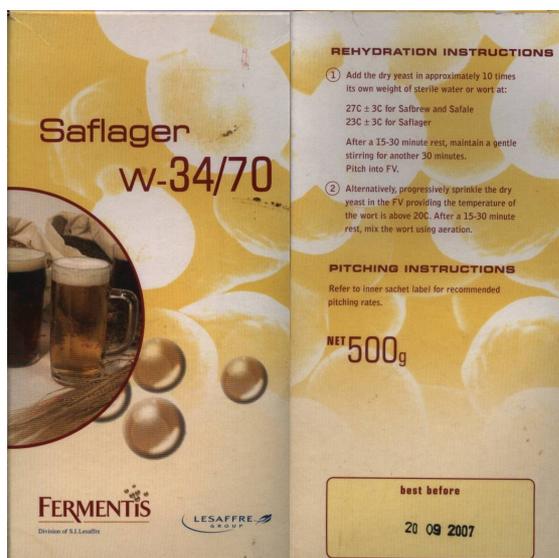
O Mel Kalena é comercializado em recipientes de 500 gramas, possuindo a inspeção realizada pelo Ministério da Agricultura como mostra a figura 5.



**Figura 5** : Foto do Rótulo do Mel Kalena, produzido na Região de Prudentópolis, fornecido pela Chapolin & Schmidt Ltda.

#### 4.2.2 Microorganismo

O microorganismo liofilizada utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* (Saflager W-34/70 – Fermentis Division of S.I. Lesaffre - França), cedido pela empresa Reinerth Indústria e Comércio de Bebidas e Conservas Ltda, localizada em Guarapuava – PR (figura 6).



**Figura 6** : Foto da embalagem da levedura utilizada (*Saccharomyces cerevisiae*).

#### 4.2.3 Medida de pH

A determinação do pH dos meios nutrientes das fermentações foi realizada empregando um pH-metro da marca Requal Equipamentos Científicos, Modelo RQ210, Série 5437/211. Com o pH-metro calibrado, amostras de 10 mL foram mantidas a temperatura ambiente, imergindo-se o eletrodo na amostra até cobrir o bulbo de vidro, esperava-se até que

não houvessem oscilações no resultado para então fazer a leitura.

#### 4.2.4 Teores de açúcares redutores

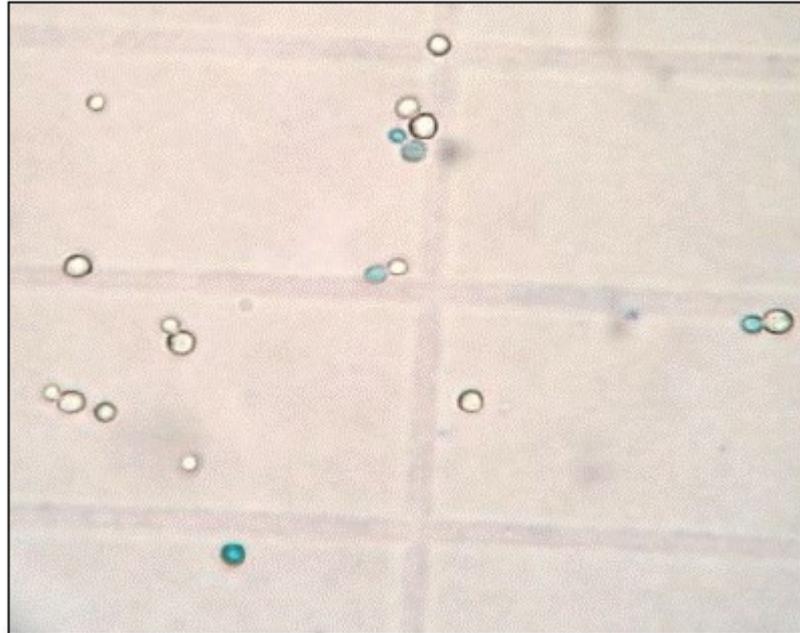
Os teores de açúcares redutores foram medidos empregando-se um refratômetro da marca AZM Máquinas e Equipamentos Ltda, modelo RT 30ATC. Duas gotas da amostra foram colocadas sobre o compartimento de análise do equipamento. Para obtenção de melhores leituras da escala de °Brix procurou-se um local com boa visibilidade.

#### 4.2.5 Microscopia

A determinação da viabilidade celular das leveduras foi feita usando-se o método colorimétrico empregando azul de metileno, proposto por Lee, Robinson e Wang (1981)<sup>[31]</sup>. A solução corante continha por litro: 0,25g de azul de metileno, 9g de NaCl; 0,48g de CaCl<sub>2</sub>; 0,2g de NaHCO<sub>3</sub> e 10g de glicose.

O sobrenadante proveniente do produto das fermentações era diluída com a solução corante. **As células de levedura com alta atividade fisiológica não colorem (figura 7), enquanto as células inativas (mortas) apresentou-se a coloração azul. Usando um microscópio com um aumento de 400 a 600 vezes e uma câmara de Neubauer é possível contar as centenas de células e calcula a razão entre o número de células não coradas e o número total de células. O resultado é expresso em % de viabilidade.**

**As leveduras são fungos unicelulares. Possuem membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem, também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacrídeos : manana e glucana, além disso, contêm proteínas e lipídios. E é essa parede rígida que age como membrana seletiva e permeável, além de proteger é responsável pela coloração.**



**Figura 7** : Determinação da viabilidade celular de leveduras com azul de metileno. As células coradas de azul são células mortas enquanto as incolores são células viáveis.

**Para realizar a técnica**, misturou-se em tubo de ensaio 0,1 mL de sobrenadante em 0,9 mL de solução corante, ou 0,2 mL de suspensão em 0,8 mL de solução corante. Agitou-se o tubo, rigorosamente, e após 1 minuto de repouso, transferiu-se uma quantidade dessa amostra para câmara Neubauer. Em seguida, utilizando um microscópio com a objetiva de 40 vezes de aumento, efetuou-se a contagem das células de levedura e bactérias. A equação 3, fornece a viabilidade expressa em porcentagem:

$$Vi = \left( \frac{NCLI}{NCLIA} \right) * 100$$

**Equação 3** : Cálculo da viabilidade celular

Onde :

- Vi = viabilidade;
- NCLI : número de células de leveduras incolores;

➤ NCLIA : número de células de leveduras incolores mais as azuis;

A concentração de células de levedura viáveis foi calculada pela equação 4:

$$C = \left( \frac{NCLI * 2,5 \cdot 10^5 * diluição}{5} \right)$$

**Equação 4 :** Cálculo da concentração de células viáveis

Expresso em número de células de leveduras viáveis por mL.

#### 4.2.6 Preparação do inoculo

Pesou-se, em balança analítica, aproximadamente 4,0 gramas da levedura liofilizada. Em seguida misturou-se com 40 mL de água esterilizada, previamente aquecida a 20°C em chapa de aquecimento. Esta mistura foi agitada até a completa solubilização para, em seguida, adicionar nos meios de fermentação.

#### 4.2.7 Meios de fermentação

Neste trabalho foram utilizados dois meios sintéticos, objetivando um comparativo do comportamento cinético e rendimento da reação. A composição dos meios estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Na tabela 5 está apresentada a composição do meio nutriente empregado para elaboração da bebida fermentada e para o estudo cinético nos conjuntos de frascos nº 1 e 2

**Tabela 5** – Composição do meio nutriente do conjunto de frascos nº 1 e 2.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	5,0
KCl	1,7
MgSO <sub>4</sub>	0,7
NH <sub>4</sub> Cl	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5

Fonte : (RIGO, 2001)<sup>[27]</sup>

O meio nutriente do conjunto de frasco número 2 sofreu esterilização a 121°C por 15 minutos sendo portanto este procedimento é o diferencial existente entre o conjunto de frascos número 1 e 2.

A tabela 6 referem-se ao meio nutriente do frasco número 2, utilizados para o estudo cinético, diferenciando-se a do frasco número 1 apenas na execução da esterilização.

**Tabela 6** – Composição do meio nutriente do frasco n° 3, descritos por MORSE

Componente	Concentração (g/L)
Biotina	$1,3 \times 10^{-5}$
Pantotenato de cálcio	$2,7 \times 10^{-3}$
Tiamina	$5,4 \times 10^{-3}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,26
Peptona	$2,7 \times 10^{-3}$

Fonte : (MORSE,1971)<sup>[28]</sup>

#### A) Preparo de hidromel

Foram investigadas várias condições experimentais para o preparo do hidromel. As fermentações foram acompanhadas através da medida do °Brix que indica o teor aproximado de açúcar no mosto. Assim um mosto com 10°Brix contém aproximadamente 10% de açúcar. Considera-se que 2°Brix produz, aproximadamente 1°GL após a fermentação<sup>[26]</sup>. Segundo Silva, Monteiro e Alcanfor (2003)<sup>[24]</sup>, o método da refratometria medida em °Brix em mel é confiável perante outros métodos, reproduzindo com bastante exatidão valores obtidos para açúcares totais. Foram observados que os melhores resultados de fermentação partiram de soluções com 16 e 28°Brix. Abaixo estão relacionados os materiais e métodos utilizados.

A composição química (nutrientes) do meio de cultura foi semelhante em todas as fermentações realizadas para o preparo do hidromel, diferindo, somente, nas concentrações de mel utilizado. As soluções de méis foram preparadas com água destilada, até atingir concentrações de 16 e 28°Brix, em seguida foram adicionados os componentes indicados na tabela 5, ajustando o pH com uma solução de ácido clorídrico 1 mol/L.

Após a preparação dos meios de fermentação, foram transferidos 500 mL destes para erlenmeyers de 1000 mL de capacidade, previamente esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Em cada erlenmeyer foi adicionado 10% de inóculo, e acondicionados por dois meses em local escuro sem agitação. Em intervalos de quinze dias foram retiradas alíquotas

de amostras para medida de pH e °Brix para acompanhamento do desenvolvimento da fermentação.

## B) Estudo cinético do mel com diferentes meios

Os meios de fermentação continham mel diluído em água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos, e após a adição dos nutrientes descritos nas tabelas 4 e 5 sofreram ajustes de pH para 4,0 com uma solução de ácido clorídrico 1 mol/L.

O ensaio de fermentação em batelada foi realizado em frascos de erlenmeyer de 125 mL contendo, aproximadamente, 40 mL de meio nutriente. Os meios de fermentação continham mel diluído em água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos, e após a adição dos nutrientes descritos nas tabelas 4 e 5 sofreram ajustes de pH para 4,0 com uma solução de ácido clorídrico 1 mol/L.

Três conjuntos cada um deles contendo três frascos denominados conjunto de frascos nº 1, 2 e 3 (figura 7) foram empregados na fermentação, que ocorreu a 30°C, com agitação de 150 rotações por minuto, sendo os meios nutrientes 1 e 2 contendo a mesma composição descrita na tabela 5. Porém o conjunto de frascos número dois sofreu esterilização. E o conjunto de frascos número três possuía a composição descrita pela tabela 6. A velocidade de formação de produto foi acompanhada através da pesagem dos frascos em balança analítica, em função do tempo, uma vez que se trata de um método bastante utilizado e obtendo assim bons resultados <sup>[4]</sup>. O início da fermentação ocorreu com a adição de 4 mL de suspensão de levedura em todos os frascos e, imediatamente, procedeu-se a primeira pesagem dos frascos em balança analítica.

Como pode ser observado na figura 8, os frascos que compõe os meios número 1 e 3, possuem coloração menos intensa que o conjunto de frascos do meio número 2, isto é decorrente da esterilização, uma vez que os meios número 1 e número 2 possuem a mesma composição, como já descrito na tabela 5, diferenciando-se apenas pela esterilização.



**Figura 8** : Amostras das triplicas dos meios n° 1, 2 e 3 respectivamente.

As amostras dos conjuntos de frascos número 1, 2 e três, eram levados em Shaker para agitação como mostra a figura 9, retirados para pesagem em intervalos de tempo de uma hora.



**Figura 9**: Amostras das triplicas dos meios n° 1, 2 e 3 respectivamente, em Shaker a 30°C com agitação de 150 rpm.

### C) Estudo cinético do mel *versus* glicose

Outro estudo comparativo foi feito para determinar a velocidade de produção de CO<sub>2</sub>, pelas células de levedura, em meio nutriente contendo mel diluído como única fonte de carbono e energia.

Com este estudo pode verificar se o mel possui algum inibidor da fermentação, sendo possível também verificar se há consumo preferencial por um dos substratos. O procedimento adotado foi o mesmo utilizado para o conjunto de frascos n° 1.

## 4.2.8 Análises em cromatografia líquida de alta eficiência

### 4.2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a quantificação dos açúcares utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters Controller 600 com injetor manual e loop de 5  $\mu\text{L}$ , equipado com detector de índice de refração Waters 2414 e detector PDA Waters 2996, utilizou-se coluna analítica de aço inox Waters Spherisorb de  $\text{NH}_2$  (4,6x250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ). A temperatura da coluna e detector foram ajustadas a 40°C.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água 80:20(v/v), com fluxo de 1 mL/min. Acetonitrila (TEDIA) foi de grau CLAE. A água ultra pura foi obtida no sistema TKA-GenPure, todos os solventes foram previamente filtrados por membrana de poliamida (Sartorius).

Os padrões utilizados de glicose anidra (D(+))glucose) e frutose (D-frutose) puríssima são da marca VETEC.

Na determinação do 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (5-HMF) utilizou-se o sistema HPLC Waters Controller 600 com detector PDA Waters 2996, a coluna Waters  $\mu\text{Bondapak}$  C-18 (3,9x300 mm, 10 $\mu\text{m}$ ). A temperatura da coluna foi ajustada a 25°C.

O padrão do 5-HMF 99% utilizado foi da marca FLUKA.

O padrão de 5-HMF de concentração 0,01243 g/mL foi preparada em água ultra pura.

A fase móvel utilizada foi  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (ácido acético 1%) – 20:80 (v/v).

A solução padrão foi injetada em triplicata e utilizando o método comparativo e obteve-se a concentração do 5-HMF presente na amostra através do software empower.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi dividido em duas partes; a primeira visou um estudo da influência de parâmetros tais como pH, agitação, concentração inicial de mel e diferentes nutrientes, na fermentação, a fim de obter condições ideais para produção do maior percentual possível de álcool. Levaram-se em conta, nesse estudo, as características sensoriais do produto final, uma vez que, de acordo Morse (1971)<sup>[28]</sup>, bebidas fermentadas, elaboradas em um tempo reduzido, produzem bebidas com paladar desagradável. A segunda parte foi à determinação da cinética de fermentação do mel, comparando diferentes meios, com variação dos nutrientes. O estudo da cinética de fermentação de um meio nutriente, contendo glicose ao invés de mel como fonte de carbono também foi feito para efeito de comparação dos resultados.

### 5.1 Preparo de hidromel

O estudo de parâmetros na produção de uma bebida fermentada com soluções a 16°Brix e 28°Brix tiveram bons resultados, com fator de conversão em massa de substrato em etanol iguais a 82,74% e 45,95%, respectivamente. Obtendo-se assim 21,14 gramas e 12,21 gramas de álcool, respectivamente em cada caso após a fermentação. Observa-se que quanto maior a quantidade de substrato (açúcares) menor foi a conversão, devido a grande quantidade de biomassa em suspensão impedindo assim a continuidade da fermentação. Estes resultados foram calculados convertendo-se o volume de etanol obtido, em massa, e então aplicando na estequiometria dada na equação. Estes permitiram concluir que o mel pode ser uma matéria-prima com bons rendimentos para a produção de uma bebida fermentada. Além de oferecer bons resultados.

Várias amostras foram preparadas alterando a quantidade de inóculo e concentração da de mel, como mostra a tabela 7.

**Tabela 7** : Resumo das condições utilizadas no preparo de amostras de hidromel

<u>°Brix inicial</u>	<u>Armazenamento</u>	<u>Inóculo (%)</u>	<u>pH</u>	<u>Agitação</u>	<u>Complementos</u>	<u>°Brix final</u>
21	25°C	0,5		-	-	14,4
21	5°C	10		-	-	19
21	25°C	10		-	Vitaminas	9
21	25°C	5		-	-	5
21	30°C	10		200rpm	-	16,5
21	25°C	10		-	-	5
21	25°C	5		-	Vitaminas	10
21	25°C	0,5		-	Vitaminas	18
28	25°C	2		-	-	15
20	25°C	2		-	-	7
16	25°C	1		-	-	6
26	25°C	5		-	Vitaminas	19
30	25°C	5		-	-	18
26	25°C	5		-	-	14
30	25°C	5		-	Vitaminas	19

Nas linhas da tabela 7, com sombreamento estão indicadas as amostras que ocorreram o aparecimento de fungos durante a fermentação, sendo portanto descartadas. Esta contaminação ocorre devido o substrato (mel) oferecer condições naturais e altamente nutritivas, ricas em matéria orgânica e inorgânica, que são fundamentais para o crescimento de uma grande variedade de microorganismos. Sendo assim mesmo com os cuidados de esterilização dos materiais utilizados, uso adequado da bancada não é surpresa encontrar o desenvolvimento de contaminantes.

Para validar o método anterior foi realizada análise em HPLC das amostras presentes na tabela 7 e de uma solução de mel diluído 16°Brix denominada padrão com objetivo de quantificar os açúcares glicose e frutose. As amostras utilizadas foram escolhidas por possuir um diferencial, ou no °Brix, nas condições de realização do experimento como : tempo de fermentação ou utilização de complexos vitamínicos.

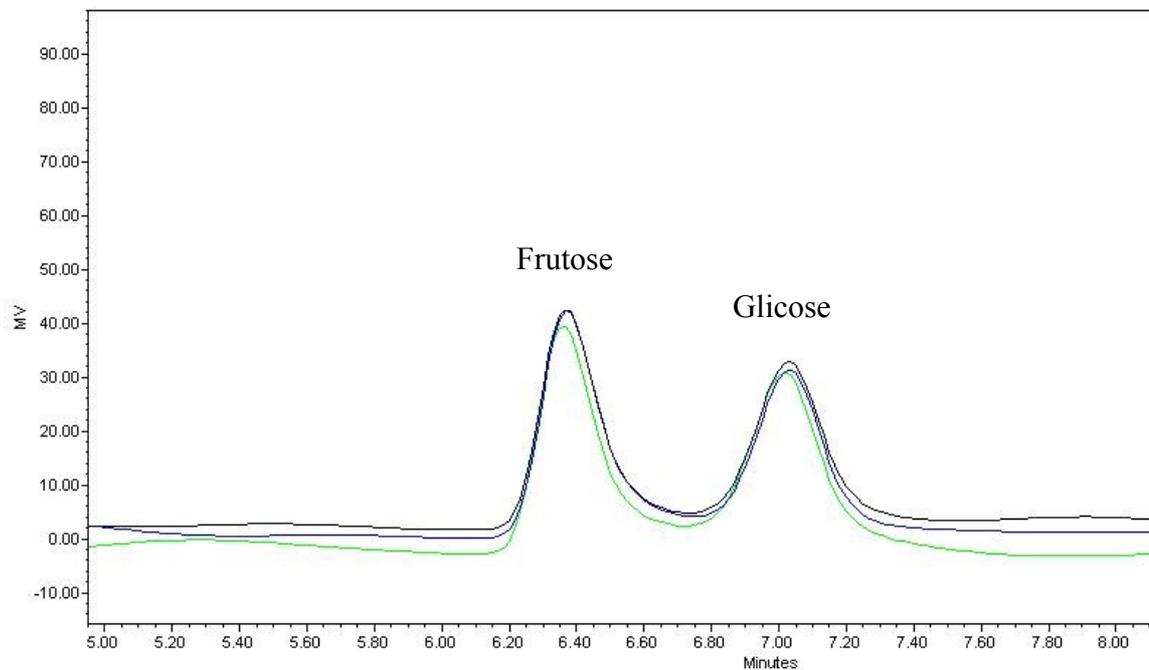
## 5.2 Análises cromatográficas

### 5.2.1 Quantificação dos açúcares

As análises foram feitas a partir de padrões preparados da mistura de frutose e glicose em água ultra pura com concentrações de 0,01 g/mL e 0,01 g/mL, respectivamente.

Cada solução padrão foi injetada em triplicata e utilizando o método comparativo obteve-se a concentração dos açúcares presentes nas amostras através do software empower.

A figura 10 mostra os cromatogramas obtidos para glicose e frutose nas amostras padrões.



**Figura 10:** Análise de açúcares na amostra padrão realizada em triplicata

Na figura 10 cada curva obtida refere-se a uma injeção da triplicata realizada, verificando-se, portanto que a análise foi confiável uma vez que observa-se a semelhança obtida durante todo o tempo de análise.

A figura 10 mostra que a frutose possui menor tempo de retenção, a resolução é boa e suficiente para determinação à concentração de glicose e frutose presentes na solução.

Para melhor comparação dos métodos fez-se os cálculos manuais pelo Fator de Resposta (FR) mostrado na equação 5 :

$$FR = \frac{[ ]}{AP}$$

**Equação 5 :** Determina o fator de resposta pelo quociente da concentração [ ] pela área do pico (AP)

O Fator de Resposta foi encontrado a partir da média da triplicata da mistura dos padrões. Na tabela 8 estão representados, mostra os valores obtidos para a frutose e a glicose em cada injeção e em seguida a média obtida para cada açúcar.

**Tabela 8 :** Valores obtidos para o cálculo do Fator de Resposta

Amostras	FR da 1 <sup>a</sup> Injeção	FR da 2 <sup>a</sup> Injeção	FR da 3 <sup>a</sup> Injeção	Média	Desvio Padrão
Frutose	$2,17 \cdot 10^{-8}$	$2,02 \cdot 10^{-8}$	$1,98 \cdot 10^{-8}$	$2,05 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-9}$
Glicose	$2,31 \cdot 10^{-8}$	$2,28 \cdot 10^{-8}$	$1,79 \cdot 10^{-8}$	$2,12 \cdot 10^{-8}$	$2,9 \cdot 10^{-9}$

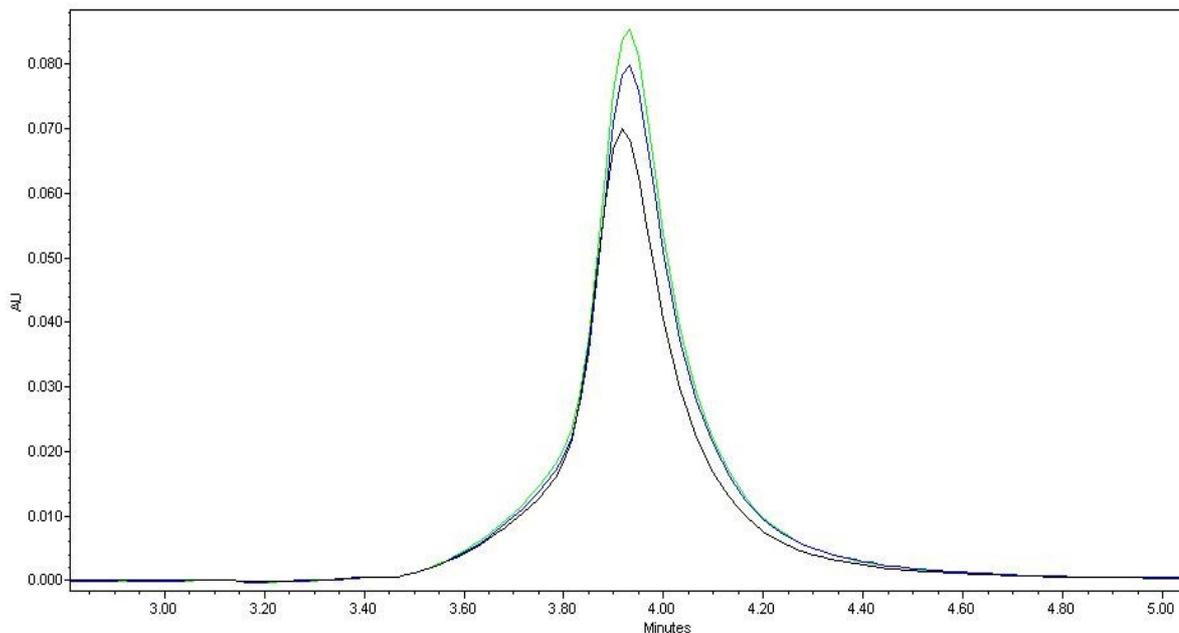
De posse do valor médio do Fator de Resposta, a amostra é injetada obtendo-se então a concentração de cada açúcar presente.

Para cada amostra analisada retirou-se alíquotas de 1 mL e diluiu-se em balão volumétrico de 10 mL.

### 5.2.2 Quantificação do 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)

Para obtenção dos resultados em cromatografia líquida de alta eficiência várias condições experimentais foram testadas até se obter uma condição adequada para sua detecção.

A figura 11 mostra o cromatograma obtido da análise em triplicata realizada para a amostra padrão do 5-HMF.



**Figura 11:** Análise de 5-HMF na amostra padrão realizada em triplicata

Novamente a confiabilidade da análise é obtida uma vez que as curvas estão muito próximas da sobreposição.

Os resultados do Fator de Resposta para as três injeções resultantes do cromatograma da figura 11 estão na tabela 9.

**Tabela 9 :** Valores obtidos para o cálculo do Fator de Resposta

<b>Amostras</b>	<b>1ª Injeção</b>	<b>2ª Injeção</b>	<b>3ª Injeção</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
5-HMF	$2,45 \cdot 10^{-6}$	$2,11 \cdot 10^{-6}$	$2,01 \cdot 10^{-6}$	$2,19 \cdot 10^{-6}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$

De posse do valor médio do Fator de Resposta, a amostra é injetada obtendo-se então a concentração do 5-HMF presente.

Para a análise da amostra retirou-se alíquotas de 1 mL e diluiu-se em balão volumétrico de 10 mL.

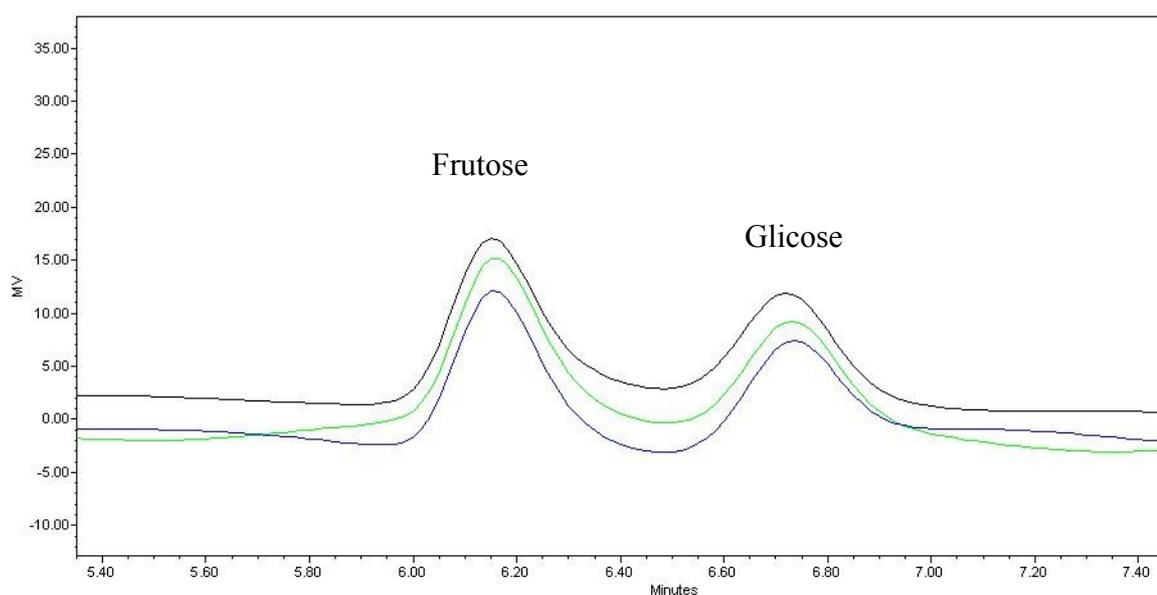
Após análises dos açúcares e 5-HMF nos padrões fez a análise das amostras de mel diluído com diferentes °Brix, utilizando o mesma metodologia.

Uma amostra de mel diluído foi preparada a partir de 3,0804 g de mel em 25 mL de solução, para posterior quantificação de glicose e frutose, a análise em HPLC foi realizada em triplicata obtendo-se os valores apresentados na tabela 10.

**Tabela 10** : Valores obtidos para o cálculo do Fator de Resposta para solução de mel diluído

Amostras	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	Média	Desvio Padrão
Frutose	0,05 g/mL	0,04 g/mL	0,05 g/mL	0,047 g/mL	0,0058
Glicose	0,04 g/mL	0,03 g/mL	0,04 g/mL	0,037 g/mL	0,0058

O cromatograma obtido para a triplicata está presente na figura 12, o primeiro pico refere-se à frutose e o segundo pico a glicose, mostrando assim que o mel utilizado tal como o mel floral possui uma maior quantidade de frutose. De acordo com Moreira (2001)<sup>[11]</sup>, os teores médios de glicose e frutose encontrados em méis florais é de 31% e 38%, sendo o resultado expresso pela soma desses dois açúcares que estão em maior quantidade no mel igual a 69%.



**Figura 12:** Análise de frutose e glicose em amostra de mel diluído

Com os dados da quantificação dos açúcares do mel, foi então realizado o cálculo para verificar se está de acordo com a bibliografia encontrada em termos de percentual. Obtendo-se a somatória de glicose e frutose, o mel analisado acusou 68%, 38,05% de frutose e 29,95% de glicose, estando de acordo com a bibliografia encontrada que referencia a frutose em maior proporção sendo a porcentagem da somatória igual a 69%, portanto tornando o método de análise confiável.

As amostras obtidas durante a fase experimental também foram submetidas a análise de cromatografia uma vez que tinha sido realizada somente a medição de °Brix. As médias do Fator de resposta para a frutose, glicose e 5-HMF, para as soluções de mel diluído com 28, 26, 30 °Brix estão esboçadas na tabela 11.

**Tabela 11:** Concentrações de glicose, frutose e Hidroximetilfurfural (HMF) obtidos para as amostras de diferentes °Brix e para uma solução padrão de mel diluído

Cálculo da Concentração	Espécies Quantificadas	Média da Triplicata					
		Mel diluído	28°Brix	26°Brix	30°Brix	26°Brix	30°Brix
Concentração (g/mL)	Frutose	0,047	0,096	0,087	0,104	0,045	0,088
Concentração (g/mL)	Glicose	0,037	0,020	0,026	0,053	0,017	0,022
Concentração (mg/mL)	HMF	MLD*	0,421	MLD*	MLD*	MLD*	MLD*

\*MLD = menor que o limite de detecção

Observa-se na tabela que o hidroximetilfurfural foi menor que o limite de detecção do aparelho, sendo relevante para o presente trabalho uma vez que o hidroximetilfurfural (HMF) é uma molécula resultante da transformação dos [monossacarídeos](#): [frutose](#) e [glicose](#).

Quanto mais calor, mais rápida é a conversão, logo, o HMF passou a ser usado como indicador de aquecimento, processamento inadequado ou mesmo adulterações em [xaropes](#) e no [mel](#). Além do calor, também o envelhecimento e o [pH](#) contribuem para a velocidade de formação do HMF, sendo um motivo de apresentar-se em pequenas quantidades da amostra de 28 °Brix a qual permaneceu em fermentação por 3 meses.

Com estes resultados estimou-se o teor total de glicose e frutose consumidos em cada uma das soluções. Os resultados estão presentes na tabela 12.

**Tabela 12** : Valores de massa residual (gramas) de açúcares (glicose + frutose) obtidos por refratometria na escala °Brix e em cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Amostras (°Brix)</b>	<b>Massa residual por refratometria</b>	<b>Massa residual por CLAE</b>
28	61,64	51,04
26	89,73	71,19
30	88,26	98,91
26	58,84	39,06
30	80,61	69,30

Silva, Monteiro, Alcanfor, Assis e Asquiere (2008)<sup>[24]</sup>, possibilitaram a determinação de sólidos solúveis por °Brix, uma vez que realizaram um estudo comparativo de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel e dentre os métodos analisados o da refratometria na escala °Brix demonstrou-se válido e confiável. Assim no presente trabalho fez-se uso desta técnica que ao ser comparada com outras é uma técnica simples e de resultados imediatos tornando-se uma ferramenta extremamente útil para as indústrias de fabricação de bebidas fermentadas.

### **5.3 Comportamento cinético**

Para o estudo do comportamento cinético utilizou-se o meio nutriente reportado na tabela 5 do item materiais e métodos para o conjunto de frascos nº 1 e nº 2

Para o conjunto de frascos nº 2 os erlenmeyers contendo o meio nutriente sem inóculo foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Um conjunto de frascos nº 3 utilizando o meio nutriente presente na tabela 6 do item materiais e métodos foi preparado para fins comparativos dos meios, porém este conjunto não sofreu esterilização.

A cinética da produção de CO<sub>2</sub> na fermentação alcoólica do mel diluído, em ensaio em batelada, mostrou que o conjunto de frascos nº 1 e 2 produziram o dobro de massa de CO<sub>2</sub> em relação ao conjunto frascos nº 3, a partir de 4 horas de fermentação (figura 9). A fase lag ou latência, é a fase existente imediatamente após a inoculação do meio com o microorganismo, consiste em um período de adaptação, durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias

ao metabolismo dos componentes presentes no meio, sua duração varia principalmente com a concentração do inóculo, com a idade do microorganismo e seu estado fisiológico. Nesse ensaio a fase lag foi de, aproximadamente, 2 horas para os três conjuntos de frascos investigados. Os conjuntos de frascos nº 1 e 2 não apresentaram diferença significativa na massa de CO<sub>2</sub> evoluída durante a fermentação .

Um ensaio, paralelo foi feito objetivando quantificar a viabilidade das células de levedura e sua concentração, durante a fermentação. O meio nutriente é o apresentado na tabela 5 do item materiais e métodos, a solução de mel diluído com 16°Brix foi transferida para erlenmeyer de 125 mL, sendo submetido a esterilização em autoclave somente o frasco com posterior adição da solução. Alíquotas de 10 mL eram retiradas de hora em hora e, imediatamente foi feita a análise microscópica. Os resultados estão apresentados na tabela 13. A viabilidade das células de levedura ficou em torno de 68,8% durante todo curso da fermentação. De acordo com Ludwing e Angelis (2001)<sup>[5]</sup> a diminuição do pH, ocorre devido a formação de ácidos orgânicos, que é intensificada com o aumento de floculação e causando uma significativa queda no rendimento alcoólico e viabilidade de leveduras.

**Tabela 13** : Viabilidade celular em função do tempo para solução de 16°Brix

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>pH</b>	<b>° Brix</b>
1	72	4,4	16
2	75	4,1	15
3	82	4,7	14
4	73	3,3	13
5	70	3,0	11
6	87	2,9	10
7	84	2,9	9
8	56	2,9	9
9	69	2,9	6

No ensaio de fermentação alcoólica do mel diluído, realizados em triplicata, foram investigados três conjuntos de frascos, designados por conjunto nº1, nº2 e nº3. Sendo apresentado nas tabelas 5 e 6 do item materiais e métodos a composição do meio nutriente de cada conjunto de frasco. Sendo que o conjunto de frascos nº2 foi submetido à esterilização.

Os valores de massa de CO<sub>2</sub> acumulados a mais nos conjuntos de frascos nº 1 e 2 em relação ao conjunto nº 3, estão representados na tabela 14.

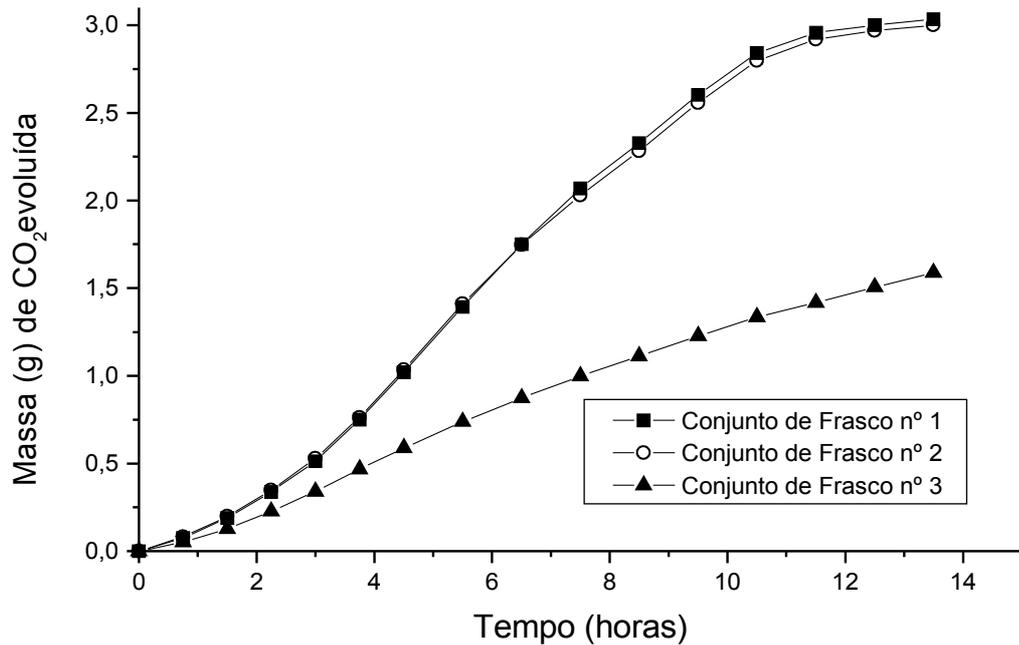
Para cada concentração inicial de substrato investigada foi feito o gráfico, em escala

semi-logarítmica, da massa de CO<sub>2</sub> evoluída *versus* tempo de fermentação, onde se obteve o valor da taxa específica de formação de produto através da inclinação da reta da que melhor ajustou os dados experimentais da fase exponencial de formação de produto.

**Tabela 14** : Massa acumulada de CO<sub>2</sub> liberada em gramas

Tempo (h)	Massa de CO <sub>2</sub> liberada (acumulada) - gramas		
	Frasco n° 1	Frasco n° 2	Frasco n° 3
0	0	0,000	0,000
0,75	0,076	0,081	0,051
1,5	0,190	0,198	0,128
2,25	0,338	0,348	0,226
3	0,514	0,530	0,340
3,75	0,750	0,762	0,468
4,5	1,020	1,034	0,589
5,5	1,392	1,410	0,739
6,5	1,751	1,747	0,873
7,5	2,070	2,030	0,999
8,5	2,327	2,283	1,112
9,5	2,603	2,556	1,228
10,5	2,842	2,797	1,335
11,5	2,956	2,919	1,416
12,5	3,001	2,969	1,506
13,5	3,035	3,000	1,588

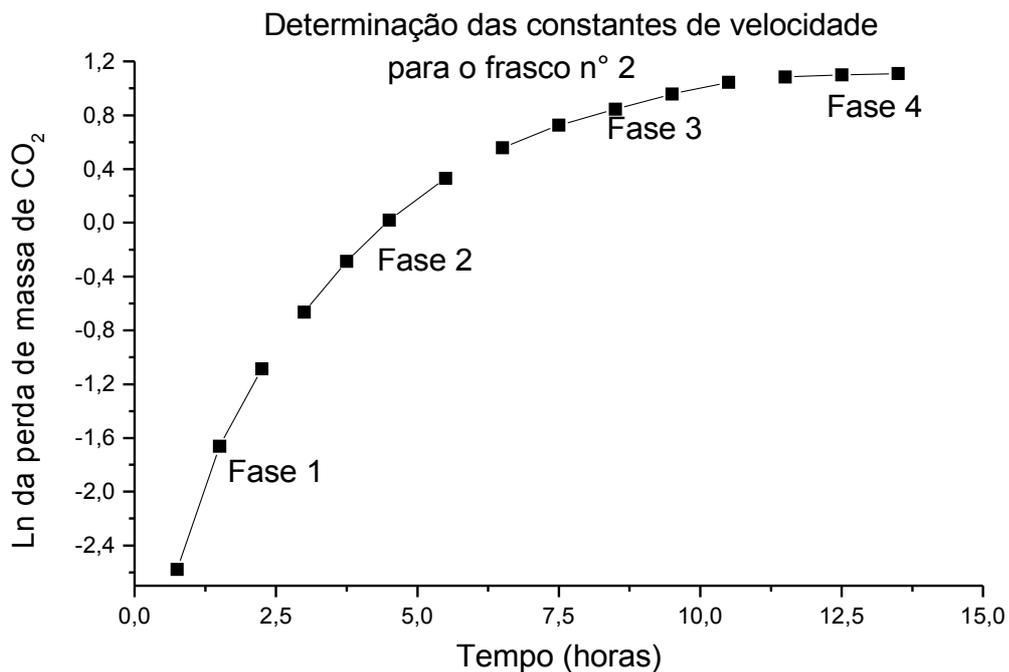
A fermentação de mel diluído por células de *Saccharomyces cerevisiae* nos frascos n°1 e n°2 sofreram aumento da velocidade de conversão de substrato a etanol e CO<sub>2</sub>, em relação a um sistema do frasco n° 3.



**Figura 13:** Ensaio de cinética de fermentação para os ensaios com 16°Brix, expressando o tempo de fermentação *versus* massa de CO<sub>2</sub> evoluída.

Observa-se na figura 13 que na fase inicial os frascos 1 e 2 possuem uma maior velocidade de formação de CO<sub>2</sub> quando comparado com o frasco 3. Isso, também, poderá ser observado nos tempos seqüentes, porém o frasco 3, em todos os tempos, continua aumentando seu percentual em massa de CO<sub>2</sub> produzido (tabela 14) enquanto os frascos 1 e 2 começam a ter um patamar de constância a partir da décima primeira hora de fermentação, o que poderá ser observado na figura 13.

A figura 14 que mostra as fases de fermentação para o frasco 2, sendo possível observar que a fase que possui maior velocidade de fermentação é a fase 1 uma vez que a massa de substrato presente é a máxima, seguida das fases 2, 3 e 4 apresentando decréscimo na velocidade decorrente da diminuição da massa de substrato.



**Figura 14 :** Ensaio de cinética de formação de produto pela levedura. Tempo de fermentação *versus* massa de CO<sub>2</sub> evoluída em escala logarítmica natural.

Nas tabelas 15 e 16 pode-se verificar que as fases 1, 2, 3 e 4 para os frascos 1 e 2 não apresentaram grandes diferenças na velocidade de fermentação, e no percentual em massa de dióxido de carbono produzido. Assim, pode-se concluir que, esterilizando ou não o meio nutriente, a velocidade de fermentação e o rendimento percentual, em massa, não são alterados.

**Tabela 15 :** Constante de velocidade da formação de CO<sub>2</sub> nos frascos 1, 2, 3

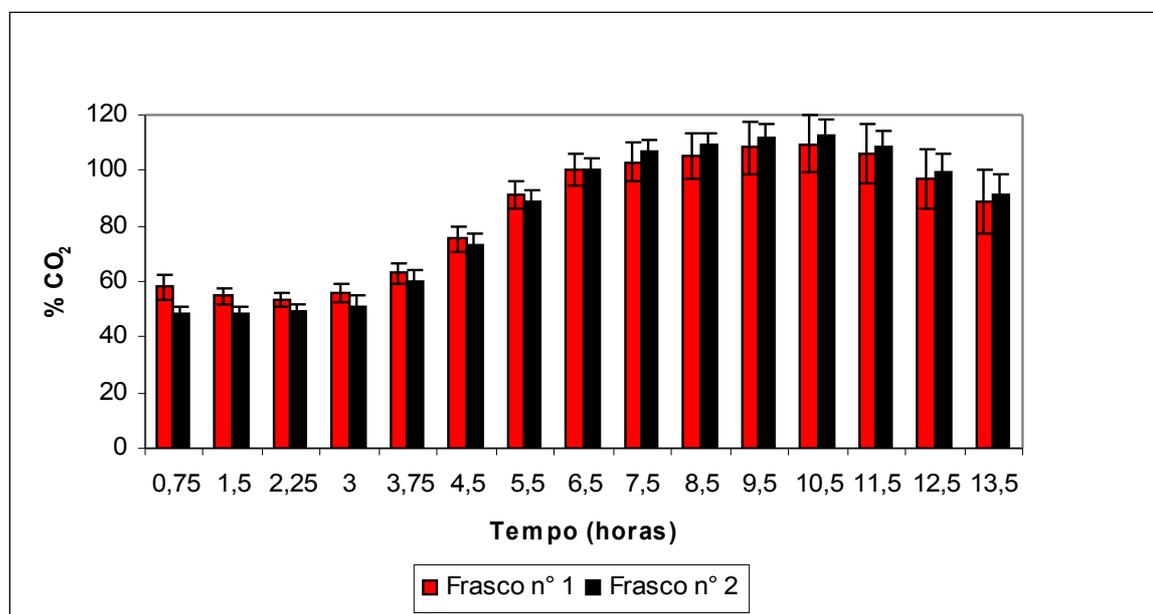
Fases	Constante de velocidade da fermentação 10 <sup>-4</sup> / min		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Fase 1	166,0	162,0	165,3
Fase 2	66,0	65,8	51,2
Fase 3	20,0	19,5	17,6
Fase 4	2,5	2,3	9,5

**Tabela 16** : Percentual em massa de CO<sub>2</sub> formado nos frascos 1, 2, 3

Fases	Percentual em massa		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Fase 1	8,6	8,9	11
Fase 2	28,93	29	25
Fase 3	35,95	35	29
Fase 4	1,48	2,7	10,8

Observa-se, também, nas tabelas 15 e 16 que a constante cinética da fase três em relação à fase dois, é aproximadamente, três vezes menor em todos os frascos. Porém observa-se que o melhor rendimento percentual em massa de dióxido de carbono produzido é do frasco três. Assim verifica-se que para a fase três a velocidade de conversão de substrato em etanol é menor, porém com maior rendimento em massa de produto.

A figura 15 mostra que a produção de CO<sub>2</sub> por células de *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios com meio nutriente n° 1 e n° 2, após oito horas de fermentação a produção de dióxido de carbono chega aproximadamente ser 100 % mais acentuada que o frasco n° 3. Isto continua sendo observado nos intervalos de tempos entre 7,5 – 11,5 horas, porém em tempos subseqüentes e antecedentes o percentual é menor, aproximadamente, 60% mas mesmo assim observa-se uma grande diferença em relação ao ensaio de n°3.



**Figura 15** : Valores de porcentagem em massa de CO<sub>2</sub> produzida a mais nos frascos n° 1 e n° 2 em relação aos de frascos n° 3.

#### 5.4 Análise de sólidos solúveis

Um estudo foi realizado com cromatografia para quantificação dos açúcares glicose e frutose residuais após a fermentação, uma vez que estes sistemas de fermentação haviam sido investigadas somente com controle da massa evoluída de CO<sub>2</sub>. A massa de CO<sub>2</sub> evoluída era obtida devido a constantemente monitoramento dos conjuntos de frascos n°1, n° 2 e n°3, mas sem sofrerem alterações nos sistemas, como retiradas de amostras para acompanhamento de sólidos solúveis através do °Brix e reposição de substrato ou inóculo, somente após o procedimento experimental alíquotas eram retiradas, centrifugadas e então analisadas através da cromatografia, sendo assim possível ter a massa residual de açúcares na amostra.

Os dados cromatográficos nos forneceram resultados compatíveis com a bibliografia mostrando o consumo preferencial pela glicose do que pela frutose, este efeito é chamado *diauxia*. O efeito diauxia consiste no consumo preferencial de um substrato em relação a outro, quando mais de um estão presentes no meio fermentativo, que é o caso da fermentação alcoólica com meios à base de sacarose. Este fato foi observado durante as análises feitas pela CLAE nos frascos n° 1, n° 2 e n° 3, apresentados na tabela 17.

**Tabela 17 :** Valores obtidos para glicose, frutose e HMF no ensaio dos frascos n°1, n°2 e n° 3;

Substâncias analisadas	Concentração			
	Frasco n° 1	Frasco n° 2	Frasco n°3	Média para frasco n°3
Frutose	MLD*	MLD*	0,024 g/mL	0,027 g/mL
	MLD*	MLD*	0,033 g/mL	
	MLD*	MLD*	0,026g/mL	
Glicose	MLD*	MLD*	MLD*	
	MLD*	MLD*	MLD*	
	MLD*	MLD*	MLD*	
HMF**	MLD*	MLD*	MLD*	
	0,0018g/mL	MLD*	MLD*	
	MLD*	MLD*	MLD*	

\* = menor que o limite de detecção.

\*\* = hidroximetilfurfural

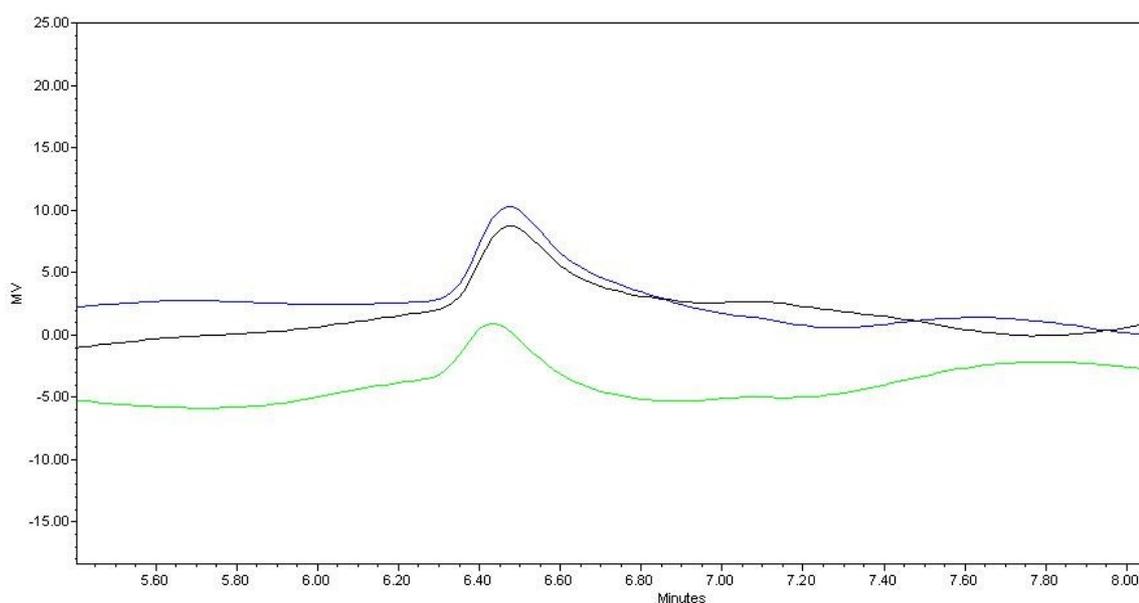
Os resultados confirmam os valores obtidos em massa, durante a realização do estudo cinético pela pesagem dos frascos, onde se verificava que os meios nutrientes dos conjuntos

de frascos n° 1, n° 2 são mais rápidos que o conjunto de frascos n° 3.

Durante a análise cromatográfica os conjuntos de frascos n° 1 e n° 2 demonstraram valores para glicose e frutose menor que o limite de detecção do equipamento já o conjunto de frascos n° 3 que utilizava um meio nutriente diferente dos outros dois, resultou em um meio mais resistente a fermentação observando a existência de frutose residual, confirmando assim o consumo preferencial pela glicose, tornando assim um método confiável para análise da cinética da fermentação do mel diluído.

A verificação do HMF foi realizada uma vez que não é permitida pela legislação a presença deste composto em bebidas alcoólicas, tornando o presente trabalho válido neste aspecto, uma vez que em que os resultados apontam para valores menores que o limite de detecção do equipamento.

As análises cromatográficas obtidas permitiram verificar que os conjuntos de frascos n° 1 e n° 2 não apresentaram picos correspondes a nenhum dos açúcares (glicose e frutose) analisados, porém o conjunto de frascos n° 3 revela através do cromatograma (figura 16) que houve o consumo de toda a glicose presente no meio, porém não ocorrendo o consumo total de frutose, confirmando assim que o meio nutriente utilizado para compor o conjunto de frascos n° 3 é mais lento e que quando há dois substratos presentes na fermentação há consumo preferencial por um deles, neste caso a glicose apresentou-se mais susceptível a fermentação.



**Figura 16 :** Resultados obtidos para a triplicata do meio nutriente do frasco n° 3.

Os cromatogramas evidenciam nas figuras 14 e 15 o não aparecimento dos picos de quantificação de glicose e frutose, porém na figura 13 obtido da análise do meio nutriente do frasco nº 2, verifica-se os picos mostrando a existência de açúcar residual após o processo fermentativo.

A presença somente de frutose é apreciável pois esta passa mais lentamente para a corrente sanguínea, sem necessitar a presença de insulina num primeiro estágio, sendo assim um diferencial para pessoas com hipoglicemia reativa, pois pode evitar picos de altos e baixos no teor de açúcar no sangue.

### **5.5 Comparativo : mel *versus* glicose**

O ensaio realizado para comparar as cinéticas de fermentação do mel diluído e da glicose pura ambas com 16 °Brix, forneceu resultados apresentados na tabela 18, que mostram que a velocidade da fermentação, utilizando como meio, a glicose, é mais eficiente nas primeiras doze horas de fermentação figura 17, uma vez que a levedura pode sofrer inibição pelo etanol produzido durante a fermentação e por outros componentes presentes no mel KALENA. O mel contém compostos indesejáveis, tais como: sulfito, ácidos orgânicos, teor elevado de sais de cálcio e magnésio, matéria em suspensão e outros.

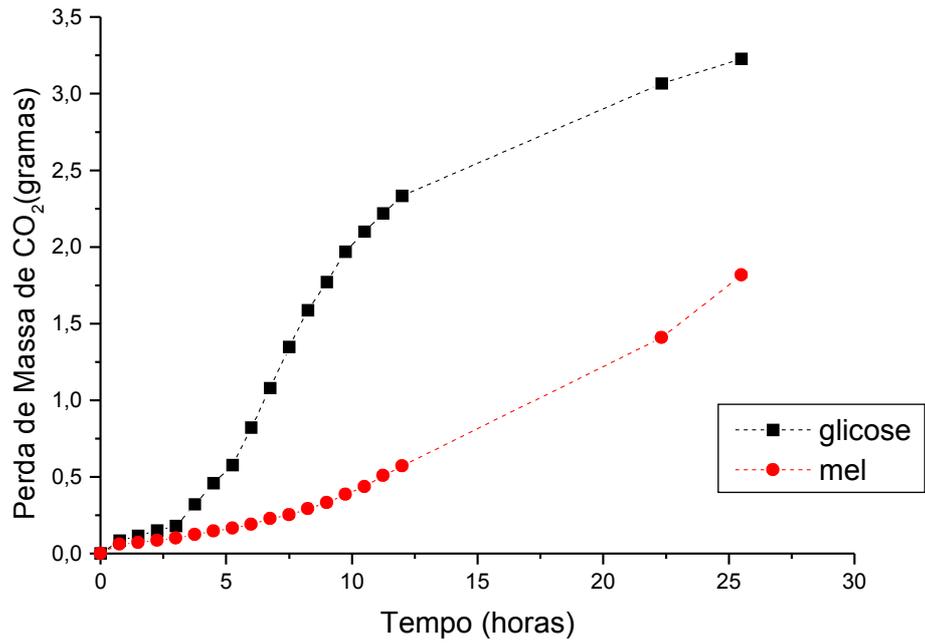
Sendo assim, o emprego do mel se traduz em inibição da fermentação, menores teores de etanol no vinho final, aumento da carga de sólidos em suspensão na fermentação e floculação do fermento. A floculação leva ao acúmulo de leveduras no fundo do recipiente dificultando a conversão dos açúcares em etanol. Apesar dos transtornos causados pela floculação das leveduras devido a presença de bactérias indutoras da floculação, não há métodos de controle industrial para caracterização e monitoramento desses agentes.

**Tabela 18 :** Média da massa acumulada de CO<sub>2</sub> para cada ensaio sendo os mesmos realizados em triplicata;

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Média da massa acumulada (gramas)</b>	
	<b>Glicose</b>	<b>Mel</b>
0	0,000	0,000
0,75	0,083	0,060
1,5	0,114	0,070
2,25	0,149	0,086
3	0,180	0,099
3,75	0,321	0,123
4,5	0,458	0,146
5,25	0,578	0,164
6	0,820	0,190
6,75	1,079	0,227
7,5	1,347	0,253
8,25	1,588	0,292
9	1,771	0,332
9,75	1,969	0,385
10,5	2,099	0,435
11,25	2,219	0,509
12	2,334	0,570
22,33	3,067	1,409
25,5	3,227	1,816

Consegue-se perceber que nas doze primeiras horas a fermentação utilizando o mel como fonte de energia é mais lenta, uma vez que a massa de CO<sub>2</sub> evoluída em função do tempo é menor do que a massa de CO<sub>2</sub> desprendida dos erlenmeyers contendo glicose como única fonte de carbono.

Porém durante todo processo fermentativo observou-se que houve um aumento na produção de CO<sub>2</sub> produzido nos frascos que utilizavam o mel como substrato da fermentação o que não ocorre com a glicose pura que a partir de certo intervalo de tempo tem aumento na massa de CO<sub>2</sub>, porém menor quando comparado com a glicose.



**Figura 17 :** Valores de massa de CO<sub>2</sub> obtidas utilizando mel e glicose durante a fermentação.

Portanto o mel pode ser utilizado como fonte de energia, mas terá um tempo de fermentação maior que outro nas mesmas condições utilizando a glicose.

## 6. CONCLUSÕES

- Fermentações alcoólicas com células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* podem ser utilizadas para obtenção de bebidas utilizando como meio de fermentação o mel.
- Observa-se que durante a fermentação alcoólica, a presença do álcool etílico ocasiona queda na viabilidade celular.
- Uma separação da biomassa adicional, visando à diminuição dos componentes que acompanham as células de levedura, durante a fermentação, é uma operação necessária, após a produção da bebida, decorrente de turvação devido a precipitação de biomassa.
- Há o consumo preferencial pela glicose quando comparado com a frutose, sendo possível verificar a existência da diauxia;
- Durante as fermentações realizadas não houve a formação de HMF, sendo, portanto os meios utilizados no trabalho favoráveis para produção de hidromel;
- Determinou-se que os meios de fermentação dependem de vários fatores não somente do meio nutriente e do microorganismo, ficando difícil estimar-se um tempo limite para a finalização da fermentação sem reabastecimento do meio por microorganismo;
- Em fermentação alcoólica, a velocidade de produção de CO<sub>2</sub>, por células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando o mel é mais lento quando comparado com glicose durante as doze primeiras horas. Isto decorrente, provavelmente, devido a componentes inibitórios contidos no mel.
- A velocidade de conversão do substrato em CO<sub>2</sub> foi praticamente igual nos conjuntos de frascos nº1 e nº2 durante a fase exponencial da fermentação ressaltando que não há alterações consideráveis em meios submetidos à esterilização ou não. O meio nutriente do conjunto de frascos nº3, específico para produção de hidromel, se mostrou mais lento que os outros dois conjuntos devido apresentarem um meio nutriente mais pobre em sais que os outros conjuntos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01) FERNANDES, Hamilton. Açúcar e Álcool – ontem e hoje. Coleção Canavieira nº 4. Rio-GB. 1971.
- 02) LIMA, Urgel de Almeida; BASSO, Luiz Carlos; AMORIM, Henrique Vianna de; Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos. Volume 3. Edgard Blücher Ltda. 2002.
- 03) TOSETTO, Gisele Mantei. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. 2002. 95p. (Mestrado no Departamento de Processos Biotecnológicos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- 04) MARQUES, Tadeu Alcides. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 24. Nº 4. Campinas. 2004.
- 05) LUDWING, K.M; P. Oliva-Neto; ANGELIS, D.F.de. Quantificação da floculação de *Saccharomyces Cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 21. Nº 1. Campinas. 2001.
- 06) MOLAN, P.C. Honey as na antimicrobial agent. In: MIZRAHI; LENSKEY. Bee Products. New York : Penum, 1996.
- 07) MARCHINI, Luís Carlos; MORETTI, Augusta C. de Camargo Carmello; OTSUK, Ivani Pozar. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera L.* no Estado de São Paulo. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Volume 25. nº 1. 2005.
- 08) BREYER, Ernesto Ulrich. Abelhas e saúde. Coleção Vale do Iguaçu nº 40. 1ª Edição. Uniporto Gráfica e Editora Ltda. SC. 1980.
- 09) CRANE, E. The past and present importance of bee products to men. In : MIZRAHI; LENSKEY. Bee Products. New York : Penum, 1996.
- 10) HOOPER, T. Guia do apicultor. Publicações Europa-América. 1976.
- 11) MOREIRA, Ricardo Felipe Alves. Glicídios no Mel. Química Nova. Volume 24, nº 4. 2001.
- 12) MUXFELDT, Hugo. Apicultura para Todos. 2ª Edição Revisada e Ampliada. Livraria Sulina Editora. Porto Alegre – RS. 1970.
- 13) COLLINS, Carol H. BRAGA, Gilberto L. BONATTO, Pierina S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 7ª Edição. Editora Unicamp. 1997. 279p.

- 14) VARGAS, Taís. Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos campos gerais do Paraná. 2006. 148 p. (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.
- 15) DAZIO, Camilla Heberle; COSTA, Janaina Aparecida; ANJOS, Márcia dos; COLUSSI, Maureen Cavalieri; TRINDADE, José L. F.; JUNIOR, Guataçara dos Santos. Análise do consumo de mel na cidade de Ponta Grossa. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Campos de Ponta Grossa. 2007.
- 16) PEREZ, Luiz Henrique. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo. Disponível em : <http://www.iea.sp.gov.br/out/vertexto.php>. Acesso em 16 jul 2008.
- 17) SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Apicultura : O Paraná no contexto do Brasil. Abril de 2005.
- 18) SILVA, Andrade. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento.2005. Disponível em : <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/file/deral/apicultura2005> Acesso em : 16 jul 2008.
- 19) CRANE, E. O livro do mel. São Paulo. Nobel, 1983.226p.
- 20) WHITE, J.W. Honey. Advances in Food Research, v.24, p. 287-374, 1978.
- 21) NATIONAL HONEY BOARD. Definition of Honey and Honey Products.2003. Disponível em : <http://www.honey.com/downloads/honeydefs.pdf>. Acesso em : 14 jul 2008.
- 22) STONOGA, V.I; FREITAS, R. J. S. de. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelha. Boletim CEPPA, Curitiba, v.9, n. 1, jan/jun.1991. p. 9 – 16.
- 23) AZEVEDO, Luciana C. de; REIS, marina M.; SILVA, Luciana A. da; ANDRADE, Jailson B. de; Efeito da Presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade on wine quality. Química Nova. Volume 30. nº 8. 2007.
- 24) SILVA, Roberto do Nascimento; MONTEIRO, Valdirene Neves; ALCANFOR, Joana D’Are Ximenes, ASSIS, Elaine Meire; ASQUIERE, Eduardo Ramirez. Comparação de Métodos Para a Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Mel. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas. 2003. set.-dez. p.337-341.
- 25) AMORIN, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D. M. G. Processo de Álcool – controle e monitoramento. Fermentec/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.
- 26) CORAZZA, Marcos L.; RODRIGUES, Dina G.; NOZAKI, Jorge; Preparação e Caracterização do Vinho de Laranja. Química Nova. Vol. 24. nº 4. 2001.p.449-452.

- 27) BASSO, Luiz Carlos. Fisiologia e Ecologia da fermentação alcoólica. Esalq/USP. Disponível em : <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Workshop\\_Etanol\\_sessao\\_%202\\_Luiz%20Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Workshop_Etanol_sessao_%202_Luiz%20Basso.pdf)>. Acesso em : 15 de dez. 2008.
- 27) RIGO, Maurício. Estudo de fermentação alcoólica por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisotila. 2001.88p. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- 28) MORSE, Roger A. Method of Making Wine from Honey. Patented Aug. 10, 1971. PI 3598607.
- 29) ATKINS, P. W. Físico Química. Volume 3. Sexta Edição. Tradução : Horácio Macedo. Editora LTC. 1997. 159p.
- 30) BORZANI, Walter. Biotecnologia Industrial. Volume II. Engenharia Química. Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª Edição. 2001. São Paulo.
- 31) LEE, S. S.; ROBINSON F. M.; WANG H. W. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium. N. 11; p. 641-649, 1981.
- 32) CIOLA, Remolo. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. 1ª Edição. Editora Edgard Blücher Ltda. 1998. 179p.
- 33) VALENTE, A. L.P. COLLINS, C.H., MANFREDI, J.E. Conceitos Básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova. v. 6. n° 3. jul.1983. p.103-109.
- 34) SILVERSTEIN, R.M. BASSLER, G. Clayton. MORRILL, Terence C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Quinta Edição. Editora Guanabara Koogan. 387p.
- 35) AQUINO, Francisco Wendel Batista. AMORIN, Adriany G. Nascimento. PRATA, Laércio Favilla. NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira. Determinação de Aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência : validação de metodologias. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24. n°1.p.32-38, jan.-mar.2004.
- 36) Anais do X Simpósio Estadual de apicultura do Paraná e VII exposição de equipamentos e materiais apícolas. Editora Universitária Champagnat. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba-Paraná. 1995.
- 37) BRASIL, Ministério da Agricultura, Portaria SIPA n° 367 de 04 de setembro de 1997. Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para mel, cera de abelhas e derivados.

- 38) CAMPOS, M. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. Boletim da Faculdade de Farmácia, v. 11, p. 17-47, 1987.
- 39) Coleção Canavieira nº 8. Divulgação do M.I.C. Instituto do açúcar e do álcool divisão administrativa de documentação.
- 40) FERNANDES, Denise; SCARTAZZINI, Luis Sergio. Produção de Hidromel Utilizando Resíduos do Processamento do Mel. Universidade do Oeste de Santa Catarina.
- 41) ODDO, L.P.; PIANA, L.; SABATINI, A.G. Conoscere il miele guida all'analisi sensorile. 2ª ed. Bolonha : Avenue Media, 1996.
- 42) ROSSEL, Carlos Eduardo Vaz. Qualidade da matéria-prima. Disponível em <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Position%20Paper%20sessao%201%20-%20Rossell.pdf>. Acesso em : 29 de nov. 2007.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)