

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DO MEL DE ABELHAS PARA A  
PRODUÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO NUTRIENTE SINTÉTICO E  
LEVEDURA COMERCIAL DE PANIFICAÇÃO**

Mestrando: Maycon Vinícius de Senna Ribeiro

Orientador: José Eduardo Olivo

Coorientadora: Monique Renon Eller

Maringá, julho de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO DO MEL DE ABELHAS PARA A  
PRODUÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO NUTRIENTE SINTÉTICO E  
LEVEDURA COMERCIAL DE PANIFICAÇÃO**

Maycon Vinícius de Senna Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José E. Olivo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Monique R. Eller

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá como  
parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química, área de Biocatálise e  
Processos Bioquímicos

Maringá – PR – Brasil, julho de 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R484e

Ribeiro, Maycon Vinícius de Senna

Estudo cinético da fermentação do mel de abelhas para a produção de hidromel utilizando nutriente sintético e levedura comercial de panificação / Maycon Vinícius de Senna Ribeiro. -- Maringá, PR, 2019.

150 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.

Coorientadora: Profa. Dra. Monique Renon Eller.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

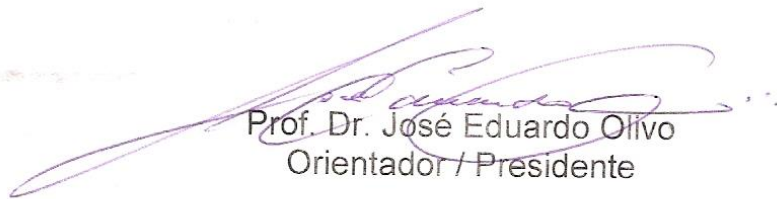
1. Mel - Fermentação. 2. Hidromel. 3. Fermentação alcoólica - Mel. I. Olivo, José Eduardo, orient. II. Eller, Monique Renon, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 23.ed. 660.63

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Maycon Vinícius de Senna Ribeiro perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 22 de julho de 2019.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. José Eduardo Olivo  
Orientador / Presidente



Prof. Dr. Cid Marcos Gonçalves Andrade  
Membro



Prof.ª Dr.ª Jane Martha Gratton Mikcha  
Membro



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Bergamasco  
Membro

## **Agradecimentos**

Primeiramente, à minha mãe, Aimeé, pelo apoio em todas as esferas, com o único objetivo de me ver bem e realizado. Principalmente, por além de ser uma vontade minha a realização desse mestrado, foi um sonho não realizado dela.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Olivo, por desde o início ter acreditado que era capaz e importante a realização de um trabalho sobre hidromel, pela paciência e atenção perante essa pesquisa, e principalmente por acender velas quando todas as luzes pareciam apagadas; à Prof. Dra. Monique Renon Eller pelo apoio prestado, mesmo sob as dificuldades da distância e por permitir que eu aprendesse muito sobre o tema. À banca examinadora presente, que se disponibilizou em contribuir com meu conhecimento. Aos profissionais do Departamento de Engenharia Química e aos meus colegas de bancada, que não mediram esforços em me ajudar, que se eu citasse-os correria o risco de esquecer de alguém.

À minha namorada Pollyana Conte Bittencourt por ter dito inúmeras vezes que tudo iria terminar da melhor maneira possível. Por ter me ouvido, ficado ao meu lado nos melhores e piores momentos dessa pesquisa. Aos meus sogros Anilton Bittencourt e Zélia Bittencourt por me acolherem em muitos fins de semana. Aos amigos de Maringá, João Henrique Dias, Lucas Pereira Pontes, João Fagundes Júnior, Gabriel Maschio, Bruno Wiedmann Dau, por terem tornado essa jornada repleta de momentos de descontração e “papos-cabeça”. Aos amigos, Antonio Hiromu Okahara Júnior, Cristiano Hideki Munis Miyadi, Lucas Moreira, Marcus Bassaco de Moraes, por me ajudarem a recarregar as baterias em bons fins de semana passados em Borrazópolis. Aos amigos de longe, Alexandre Coccia dos Santos, Heric Denis Farias, Chrystian Lenon Remes, Marcos Raposo Pliacekos que através das redes sociais e presencialmente contribuíram em me apoiar nessa empreitada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento financeiro através de bolsa de estudos.

*“Primeiro, lembre-se sempre de olhar para as estrelas e não para seus pés. Segundo, nunca desista do seu trabalho. Trabalho nos dá sentido e propósito, e sem ele a vida seria vazia. Terceiro, se você for sortudo o suficiente para encontrar o amor, lembre-se que ele está lá e não o jogue fora – Stephen Hawking”*

## **Glossário**

**ABV:** Do inglês “alcohol by volume” ou concentração em volume de álcool;

**Metheglyn:** Hidromel produzido com ervas e especiarias como adjuntos;

**Téj:** Hidromel tradicional da Etiópia;

**DAP:** Fosfato diamônio;

**Glicólise:** Processo metabólico da transformação da glicose em piruvato;

**G6P:** Glicose-6-fosfato;

**F6P:** Frutose-6-fosfato;

**NADH:** Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido;

**NAD:** Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado;

**Off-flavor:** Da tradução livre “gosto ruim”, ou substância causadora de aroma ou sabor indesejável na bebida alcoólica;

**ATP:** Adenosina Trifosfato;

**HMF:** Hidroximetilfurfural;

**Pi:** Fosfato inorgânico

**FAN:** Do inglês “free amino nitrogen” ou amino nitrogênio livre;

**YAN:** Do inglês “yeast assimilable nitrogen” ou nitrogênio assimilável pelas leveduras;

## Resumo

O hidromel é a bebida alcoólica produzida a partir de uma solução de mel de abelhas, sais nutrientes e água potável, podendo apresentar de 4 à 14 ABV à 20 °C. O mel de abelhas é uma substância complexa, produzida pelas abelhas melíferas composto principalmente por glicose e frutose. O mosto de hidromel, devido à baixa quantidade de conteúdo mineral, nitrogênio assimilável e alta concentração de açúcar, necessita de suplementação nutricional, devido ao estresse sofrido pelas leveduras, apresentando longo período fermentativo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da concentração do mel de abelhas, em batelada e batelada alimentada, e os efeitos da adição do nutriente de forma fracionada ao longo da fermentação. Foram avaliados 7 ensaios fermentativos, em que 3 deles foram em batelada de substrato e adição total de nutrientes, 2 ensaios foram realizados em batelada de substrato e adição fracionada de nutrientes, 1 ensaio com batelada alimentada de substrato e adição fracionada de nutrientes e 1 ensaio com batelada alimenta de substrato e adição total de nutrientes. Os resultados apresentados sugeriram que maiores velocidades específicas de crescimento microbiano diminuem o rendimento e a eficiência em etanol. Entretanto, batelada alimentada de substrato e a adição fracionada de nutrientes de forma conjunta apresentaram os melhores resultados em relação ao rendimento de etanol e a produção de glicerol. Conclui-se então, que as técnicas empregadas nesse trabalho melhoraram o processo fermentativo nas condições utilizadas, porém mais experimentos são necessários para que seja compreendido os efeitos da realimentação de substrato e o fracionamento de nutrientes no produto final.



## **Abstract**

Mead is an alcoholic beverage produced from a solution of honey, nutrient salts and drinking water. It can be from 4 to 14 ABV at 20 °C. Honey is a complex substance produced by honey bees mainly composed by glucose and fructose. The mead wort, due to the low amount of mineral content, assimilable nitrogen and high sugar concentration, needs nutritional supplementation due to the stress suffered by yeasts, presenting a long fermentative process. The present work aimed to evaluate the effects of honey concentration in batch and fed batch, and the effects of nutrient addition in a fractional way during fermentation. Seven fermentative assays were evaluated, where 3 of them were in substrate batch and total nutrient addition, 2 trials were performed in substrate batch and fractional nutrient addition, 1 assay with substrate fed batch and fractional nutrient addition and 1 assay with fed-batch of substrate and total nutrient addition. The results presented suggested that higher specific microbial growth rates decrease ethanol yield and efficiency. However, substrate fed batch and fractional nutrient addition together showed the best results in relation to ethanol yield and glycerol production. It was concluded that the techniques used in this present work improved the fermentation process under the conditions used, but more experiments are needed to understand the effects of substrate feedback and nutrient fractionation in the final product.

## Lista de Figuras

Figura 1 – Gravura em pedra de homínídeo coletando mel de uma colmeia em Zimbábue. (Fonte: <a href="http://www.ibra.org.uk">www.ibra.org.uk</a> ) .....	4
Figura 2 - Rotas metabólicas dentre os microrganismos. Adaptado de El-Mansi <i>et al.</i> (2011) .....	18
Figura 3 - Biorreações envolvidas na conversão da glicose em piruvato pela via glicolítica. Fonte: Liu, 2016.....	19
Figura 4 - Metabolismo fermentativo para bactérias (A) e leveduras (B). Fonte: Liu, 2016 .....	20
Figura 5 - Velocidade específica de crescimento (A) e as fases da curva de crescimento microbiano em escala linear (B) e logarítmica (C). Fonte: Hiss, 2013 .....	21
Figura 6 - Curvas padrão para uma cinética de consumo de substrato por determinado microrganismo. Fonte: Hiss, 2013.....	25
Figura 7 - Principais rotas metabólicas envolvidas na produção de metabólitos por leveduras. Adaptado de Abbas, 2006, p. 285 .....	27
Figura 8 - Relação catabólica entre aminoácidos como leucina, isoleucina e treonina na produção de álcoois superiores. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.....	29
Figura 9 - Esquema da produção de ácidos graxos pelas leveduras. Fonte: Abbas, 2006, p. 285. ....	30
Figura 10 – Esquema da produção de ésteres de ácidos graxos pelas leveduras. Fonte: Abbas, 2006, p. 285. ....	31
Figura 11 – Descarboxilação e formação de diacetil e pentano-2,3-diona. Adaptado de Abbas, 2006, p. 285.....	32
Figura 12 – Compostos fenólicos produzidos pelas leveduras durante a fermentação e seus precursores. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.....	33
Figura 13 – Mecanismo de osmoproteção de glicerol das leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003. ....	36
Figura 14 – Alterações moleculares causadas pelas espécies oxidativas derivadas do oxigênio. Fonte: Hohman & Mager, 2003. ....	37
Figura 15 – Típica mudança diáuxica em uma fermentação em que a fonte de carbono (açúcares) é limitante. Fonte: Hohman & Mager, 2003. ....	39

Figura 16 – Fluxo de carbono nas células de leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003. ....	40
Figura 17 – Mecanismos de reserva energética das leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.....	43
Figura 18 – Obtenção do mel na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM). Fonte: O autor. ....	45
Figura 19 – Fermento comercial de panificação Itaiquara® utilizado na pesquisa. Fonte: O autor. ....	46
Figura 20 – Maceração e mistura do nutriente. Fonte: O autor.....	48
Figura 21 – Ensaio conduzido pelo autor. Fonte: O autor. ....	50
Figura 22 – Retirada do sobrenadante das amostras coletas. Fonte: O autor. ....	51
Figura 23 – Leveduras sendo lavadas por centrifugação com água destilada. Fonte: O autor. ....	52
Figura 24 - Cromatograma típico das análises realizadas por HPLC. Fonte: O autor. ....	54
Figura 25 – Curva de pH para o ensaio 1. ....	60
Figura 26 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logarítimo natural da biomassa (b) para o ensaio 1. ....	61
Figura 27 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 1. .....	62
Figura 28 – Perfil de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 1. ....	63
Figura 29 – Resultados para a análise de FAN do ensaio 1. ....	64
Figura 30 – Curva de pH para o ensaio 2. ....	66
Figura 31 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logarítimo natural da biomassa (b) para o ensaio 2. ....	67
Figura 32 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 2. .....	68
Figura 33 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 2.....	69
Figura 34 – Resultados para a análise de FAN do ensaio 2. ....	70
Figura 35 – Curva de pH para o ensaio 3. ....	72
Figura 36 – Dados experimentais da concentração de biomassa (a) e o logarítimo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 3.....	73

Figura 37 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 3. .....	74
Figura 38 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 3.....	75
Figura 39 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 3. ....	76
Figura 40 – Curva de pH para o ensaio 4. ....	78
Figura 41 – Dados experimentais de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 4.....	79
Figura 42 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 4. As flechas indicam os momentos das adições de nutrientes. ....	80
Figura 43 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 4.....	81
Figura 44 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 4. ....	82
Figura 45 – Curva de pH para o ensaio 5. ....	84
Figura 46 – Dados experimentais da concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 5.....	85
Figura 47 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 5. .....	86
Figura 48 – Perfis de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 5.....	87
Figura 49 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 5. ....	88
Figura 50 – Curva de pH para o ensaio 6. ....	90
Figura 51 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 6. ....	91
Figura 52 – Consumo de glicose, frutos e produção de etanol para o ensaio 6. As flechas pretas representam os momentos de adição de nutrientes e a flecha vermelha o momento da realimentação de mel.....	92
Figura 53 – Perfis de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 6.....	93
Figura 54 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 6. ....	94
Figura 55 – Curva de pH para o ensaio 7. ....	96
Figura 56 – Dados experimentais de concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 7.....	97

Figura 57 – Consumo de glicose, frutos e produção de etanol para o ensaio 7. .....	98
Figura 58 – Perfis de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 7.....	99
Figura 59 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 7. ....	100
Figura 60 – Correlação observada entre a velocidade específica da fase exponencial e a eficiência em etanol.....	102
Figura 61 - Curva padrão para o cálculo da concentração de glicose.....	115
Figura 62 – Curva padrão para o cálculo da concentração de frutose. ....	116
Figura 63 – Curva padrão para o cálculo da concentração de glicerol.....	117
Figura 64 – Curva padrão para o cálculo da concentração de ácido acético. ....	118
Figura 65 – Curva padrão para o cálculo da concentração de etanol. ....	119
Figura 66 – Curva padrão para o cálculo da concentração de biomassa.....	120
Figura 67 – Curva padrão para o cálculo da concentração de amino nitrogênio livre (FAN). ....	122
Figura 68 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isoamílico. .....	123
Figura 69 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool 2-feniletil. .....	124
Figura 70 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isobutílico. .....	125

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição genérica do mel de abelhas. (adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2016) .....	3
Tabela 2 – Proporção mel/água na produção de hidromel na Polônia. (EUR-Lex, 2012) .....	8
Tabela 3 – Nutrientes comerciais para vinhos e hidroméis. (adaptado de LallemandWine®).....	11
Tabela 4 – Principais fermentos utilizados na produção de hidromel. (Adaptado de PIATZ, 2014) .....	13
Tabela 5 – Principais agentes clarificantes comerciais para vinhos e hidroméis. (Adaptado de Pascoal <i>et al.</i> , 2017) .....	16
Tabela 6 – Principais compostos de aroma em bebidas alcoólicas. Fonte: Abbas, 2006, p. 285. ....	28
Tabela 7 – Intermediários para a utilização de fontes nitrogenadas pelas leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.....	41
Tabela 8 – Informações da composição do levedo de cerveja hidrolisado da Nutryervas®. ....	47
Tabela 9 – Ensaio fermentativos e suas respectivas condições de concentração de substrato e concentração de nutrientes. ....	49
Tabela 10 – Qualidade do Mel utilizado utilizado nos ensaios fermentativos... 58	
Tabela 11 – Condições experimentais para o ensaio 1.....	59
Tabela 12 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação do ensaio 1. ....	59
Tabela 13 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 1 no tempo de 81,54 horas de fermentação. ....	64
Tabela 14 – Parâmetros medidos para o ensaio 2.....	65
Tabela 15 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 2. ....	65
Tabela 16 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 2 no tempo de 55,94 horas de fermentação. ....	70
Tabela 17 – Parâmetros medidos para o ensaio 3.....	71
Tabela 18 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 3. ....	71

Tabela 19 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 3 no tempo de 59,56 horas de fermentação. ....	76
Tabela 20 – Parâmetros medidos para o ensaio 4.....	77
Tabela 21 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 4. ....	77
Tabela 22 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 4 no tempo 59,5 horas de fermentação. ....	82
Tabela 23 – Parâmetros medidos para o ensaio 5.....	83
Tabela 24 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 5. ....	83
Tabela 25 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 5 no tempo de 47 horas de fermentação. ....	89
Tabela 26 – Parâmetros medidos para o ensaio 6.....	89
Tabela 27 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 6. ....	90
Tabela 28 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 6 no tempo de 60 horas de fermentação. ....	94
Tabela 29 – Parâmetros medidos para o ensaio 7.....	95
Tabela 30 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 7. ....	95
Tabela 31 – Concentração de voláteis detectadas na ensaio 7 no tempo de 69,88 horas de fermentação. ....	100
Tabela 32 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de glicose. ....	115
Tabela 33 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de frutose. ....	116
Tabela 34 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de glicerol.....	117
Tabela 35 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de ácido acético .....	118
Tabela 36 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de etanol .....	119
Tabela 37 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de biomassa.....	120

Tabela 38 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de FAN.....	121
Tabela 39 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool isoamílico.....	122
Tabela 40 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool 2-feniletil.....	123
Tabela 41 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool isobutílico.....	124
Tabela 42 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH do ensaio 1.....	126
Tabela 43 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 1.....	127
Tabela 44 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 1.....	127
Tabela 45 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de concentração de glicerol e ácido acético para o ensaio 1.....	128
Tabela 46 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 1.....	128
Tabela 47 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH para o ensaio 2.....	129
Tabela 48 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa para o ensaio 2.....	129
Tabela 49 – Dados experimentais de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 2.....	130
Tabela 50 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 2.....	131
Tabela 51 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 2.....	131
Tabela 52 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH para o ensaio 3.....	132
Tabela 53 – Dados utilizados para a construção do gráfico de biomassa para o ensaio 3.....	133
Tabela 54 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 3.....	134



Tabela 55 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 3. ....	135
Tabela 56 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 3.....	135
Tabela 57 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 4.....	136
Tabela 58 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 4 .....	137
Tabela 59 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 4.....	138
Tabela 60 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 4. ....	139
Tabela 61 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 4.....	139
Tabela 62 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 5.....	140
Tabela 63 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa do ensaio 5 .....	141
Tabela 64 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 5.....	142
Tabela 65 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 5 .....	143
Tabela 66 – Dados experimentais para a construção do gráfico de FAN do ensaio 5. ....	143
Tabela 67 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH do ensaio 6.....	144
Tabela 68 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 6. ....	145
Tabela 69 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 6.....	146
Tabela 70 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 6.....	147
Tabela 71 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de FAN para o ensaio 6.....	147

Tabela 72 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 7.....	148
Tabela 73 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa para o ensaio 7 .....	148
Tabela 74 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 7.....	149
Tabela 75 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 7.....	150
Tabela 76 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de FAN para o ensaio 7.....	150

## Lista de Equações

Equação 01 – Velocidade específica de crescimento microbiano.....	20
Equação 02 – Integração da velocidade específica de crescimento microbiano para a fase exponencial de crescimento .....	22
Equação 03 – Logaritmo natural da concentração de células em função do tempo .....	22
Equação 04 – Regressão linear do tipo $Y=aX+b$ .....	22
Equação 05 – Velocidade específica de consumo de substrato .....	24
Equação 06 – Velocidade específica de formação de produto .....	25
Equação 07 – Relação entre as velocidades de formação de produto e crescimento microbiano através do rendimento de produto em células .....	25
Equação 08 – Relação entre as velocidades de formação de produto e consumo de substrato através do rendimento de produto em substrato .....	26
Equação 09 – Relação entre as velocidades específicas de formação de produto e crescimento microbiano através do rendimento de produto em células.....	26
Equação 10 – Relação entre as velocidades específicas de formação de produto e consumo de substrato através do rendimento de produto em substrato.....	26
Equação 11 – Curva padrão para o cálculo da concentração de glicose.....	53
Equação 12 – Curva padrão para o cálculo da concentração de frutose.....	53
Equação 13 – Curva padrão para o cálculo da concentração de glicerol.....	53
Equação 14 – Curva padrão para o cálculo da concentração de ácido acético.....	53
Equação 15 – Curva padrão para o cálculo da concentração de etanol .....	54
Equação 16 – Curva padrão para o cálculo da concentração de biomassa.....	55
Equação 17 – Curva padrão para o cálculo da concentração de FAN.....	55
Equação 18 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isoamílico .....	56
Equação 19 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool 2-feniletil .....	56
Equação 20 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isobutílico .....	56
Equação 21 – Cálculo do rendimento de glicose e frutose em etanol.....	57
Equação 22 – Cálculo da eficiência de glicose e frutose em etanol.....	57

## Sumário

Glossário.....	7
Sumário.....	20
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
2.1. O Mel de Abelhas.....	2
2.1.1. Definição e composição.....	2
2.1.2. Mercado Brasileiro .....	3
2.2. O Hidromel.....	4
2.2.1. Histórico.....	4
2.2.2. Mercado.....	6
2.2.3. Processo de produção .....	7
2.2.3.1. Preparo do mosto .....	8
2.2.3.2. Suplementação Nutricional.....	9
2.2.3.3. Fermentos .....	12
2.2.3.4. Clarificação e Maturação.....	15
2.3. Processos Fermentativos.....	17
2.3.1. Glicólise .....	18
2.3.2. Metabolismo Fermentativo.....	19
2.3.3. Cinética de Fermentações .....	20
2.3.3.1. Análise do Crescimento Microbiano .....	20
2.3.3.2. Análise do Consumo de Substrato e Formação de Produtos .....	24
2.4. Metabólitos Secundários.....	26
2.4.1. Álcoois superiores.....	27
2.4.2. Ácidos Graxos.....	29

2.4.3.	Ésteres.....	30
2.4.4.	Compostos Fenólicos, Carbonílicos e Sulfúricos .....	31
2.4.5.	Outros compostos.....	33
2.5.	Estresse Fermentativo .....	33
2.5.1.	Resposta às mudanças de temperatura .....	34
2.5.2.	Resposta à mudanças na pressão osmótica .....	34
2.5.3.	Resposta ao estresse oxidativo .....	36
2.5.4.	Adaptação à limitação de nutrientes .....	38
2.5.4.1.	Limitação de fontes de carbono.....	39
2.5.4.2.	Limitação de fontes de nitrogênio .....	41
2.5.4.3.	Limitação de fontes de fósforo.....	41
2.5.4.4.	Limitação de fontes de enxofre.....	42
2.5.4.5.	Respostas comuns à falta de nutrientes.....	42
3.	Motivação e Objetivos.....	44
4.	Materiais e Métodos.....	45
4.1.	Mel de Abelhas .....	45
4.2.	Levedura .....	45
4.3.	Nutrientes.....	46
4.4.	Ensaio Fermentativos.....	48
4.4.1.	Coleta e preparo de amostras.....	50
4.5.	Metodologias de análise.....	52
4.5.1.	Quantificação de Glicose, Frutose, Glicerol, Ácido Acético e Etanol nas amostras .....	52
4.5.1.1.	Curva padrão para Glicose .....	53
4.5.1.2.	Curva padrão para Frutose.....	53
4.5.1.3.	Curva padrão para Glicerol.....	53
4.5.1.4.	Curva padrão para Ácido acético.....	53

4.5.1.5.	Curva padrão para Etanol.....	53
4.5.2.	Biomassa (massa úmida).....	55
4.5.3.	Análise de Nitrogênio Amino Livre (FAN).....	55
4.5.4.	Quantificação de compostos voláteis nas amostras .....	55
4.6.	Análises dos resultados obtidos .....	56
4.6.1.	Fase exponencial de crescimento.....	56
4.6.2.	Ajustes polinomiais para o consumo de glicose, frutose e produção de etanol	56
4.6.3.	Cálculo de rendimento e eficiência em etanol.....	57
5.	Resultados e Discussão .....	58
5.1.	Caracterização do Mel de Abelhas.....	58
5.2.	Resultados dos Ensaio Fermentativos .....	58
5.2.1.	Ensaio 1 .....	59
5.2.1.1.	pH ao longo da fermentação .....	59
5.2.1.2.	Biomassa.....	60
5.2.1.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	61
5.2.1.4.	Glicerol e Ácido acético .....	62
5.2.1.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN).....	63
5.2.1.6.	Análise de Voláteis .....	64
5.2.2.	Ensaio 2.....	65
5.2.2.1.	pH ao longo da fermentação .....	65
5.2.2.2.	Biomassa.....	66
5.2.2.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	67
5.2.2.4.	Glicerol e Ácido acético .....	68
5.2.2.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN).....	69
5.2.2.6.	Análise de Voláteis .....	70
5.2.3.	Ensaio 3.....	71

5.2.3.1.	pH ao longo da fermentação .....	71
5.2.3.2.	Biomassa .....	72
5.2.3.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	73
5.2.3.4.	Glicerol e Ácido acético .....	74
5.2.3.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	75
5.2.3.6.	Análise de Voláteis .....	76
5.2.4.	Ensaio 4 .....	77
5.2.4.1.	pH ao longo da fermentação .....	77
5.2.4.2.	Biomassa .....	78
5.2.4.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	79
5.2.4.4.	Glicerol e Ácido acético .....	80
5.2.4.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	81
5.2.4.6.	Análise de Voláteis .....	82
5.2.5.	Ensaio 5 .....	83
5.2.5.1.	pH ao longo da fermentação .....	83
5.2.5.2.	Biomassa .....	84
5.2.5.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	85
5.2.5.4.	Glicerol e Ácido acético .....	86
5.2.5.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	87
5.2.5.6.	Análise de Voláteis .....	88
5.2.6.	Ensaio 6 .....	89
5.2.6.1.	pH ao longo da fermentação .....	90
5.2.6.2.	Biomassa .....	90
5.2.6.3.	Glicose, Frutose e Etanol .....	91
5.2.6.4.	Glicerol e Ácido acético .....	92
5.2.6.5.	Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	93
5.2.6.6.	Análise de Voláteis .....	94

5.2.7. Ensaio 7 .....	95
5.2.7.1. pH ao longo da fermentação .....	95
5.2.7.2. Biomassa .....	96
5.2.7.3. Glicose, Frutose e Etanol .....	97
5.2.7.4. Glicerol e Ácido acético .....	98
5.2.7.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	99
5.2.7.6. Análise de Voláteis .....	100
5.3. Discussão dos Ensaio Fermentativos.....	101
5.3.1. pH .....	101
5.3.2. Biomassa .....	101
5.3.3. Consumo de glicose, frutose e produção de etanol .....	102
5.3.4. Glicerol e Ácido acético.....	103
5.3.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN) .....	104
5.3.6. Quantificação de compostos voláteis.....	105
5. Conclusão .....	107
6. Referências .....	108
Apêndice A – Construção das curvas padrão .....	115
A1. Curva padrão para a concentração de glicose .....	115
A2. Curva padrão para a concentração de frutose .....	116
A3. Curva padrão para a concentração de glicerol .....	117
A4. Curva padrão para a concentração de ácido acético.....	118
A5. Curva padrão para a concentração de etanol.....	119
A6. Curva padrão para a concentração de biomassa .....	120
A7. Curva padrão para a concentração de FAN .....	121
A8. Curva padrão para a concentração de álcool isoamílico .....	122
A9. Curva padrão para a concentração de álcool 2-feniletil.....	123
A10. Curva padrão para a concentração de álcool isobutílico .....	124



Apêndice B – Dados utilizados na construção dos gráficos dos ensaios .....	126
B1. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 1 .....	126
B2. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 2 .....	128
B3. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 3 .....	131
B4. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 4 .....	135
B5. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 5 .....	139
B6. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 6 .....	143
B7. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 7 .....	147

## 1. Introdução

O hidromel é, provavelmente, a bebida alcoólica mais antiga da humanidade. Foi amplamente consumido por romanos, egípcios e escandinavos, e muito das vezes foi remetido à nobreza (Schramm, 2003). Segundo a legislação brasileira, é a bebida proveniente da fermentação de uma solução de mel de abelhas, sais nutrientes e água potável, apresentando de 4 a 14% (v/v) de álcool etílico (Brasil, 2009).

O mosto de hidromel geralmente apresenta alta concentração de açúcares, baixo conteúdo mineral, baixas concentrações de nitrogênio assimilável e é constituído de compostos inibidores do crescimento microbiano (Iglesias *et al.*, 2014). Essa composição confere lentos processos fermentativos na produção do hidromel, pois torna-se um meio de estresse para os fermentos empregados.

A suplementação do mosto com sais de nitrogênio e minerais, assim como o emprego de fermentos específicos são medidas empregadas para acelerar a fermentação do mosto de hidromel, bem como favorecer substâncias de aroma e sabor, como álcoois superiores e ésteres. A adição de nitrogênio no início da fase estacionária e no tempo inicial de fermentação mostrou-se eficaz na produção de vinhos, com o intuito de impedir fermentações lentas e travadas (Blateyron & Sablayrolles, 2001).

Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivo estudar a cinética de fermentação de um mosto base de hidromel, utilizando mel de abelhas produzido na Universidade Estadual de Maringá, suplemento sintético à base de extrato de levedo hidrolisado e fosfato diamônio e levedura comercial de panificação, avaliando os efeitos da realimentação de mel e da dosagem fracionada de nutrientes durante o processo.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. O Mel de Abelhas**

#### **2.1.1. Definição e composição**

O mel é definido, pela legislação brasileira, como sendo o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou de outras secreções, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos de colmeia (Brasil, 2000). A maioria do mel produzido no mundo é produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera*, entretanto as abelhas sem ferrão, como a *Tetragonisca angustula* e as abelhas do gênero *Melipona* também o fazem, porém em quantidade menor. O mel produzido é uma substância viscosa, que varia sua cor do branco pálido ao âmbar escuro, rica em carboidratos, ácidos orgânicos, enzimas, minerais compostos fenólicos (Alvarez-Suarez *et al.*, 2018).

O mel é constituído em sua grande maioria por glicose, frutose e água (Tabela 1). Outros compostos, em menores quantidades são encontrados no mel: vitaminas, carotenóides, aminoácidos livres, proteínas e polifenóis, associados em diversos estudos por propriedades benéficas ao corpo humano, ligadas aos níveis de compostos bioativos. Compostos fenólicos, por exemplo, são antioxidantes naturais (Nascimento *et al.*, 2018).

A composição do mel varia de acordo com fatores como condições climáticas, região, período do ano, espécies de flores e plantas e a espécie da abelha (da Costa *et al.*, 2018).

**Tabela 1 – Composição genérica do mel de abelhas. (adaptado de Silva *et al.*, 2016)**

<b>Composição</b>	<b>Faixa média (% em massa)</b>
Frutose	30-45
Glicose	24-40
Sacarose	0,1-4,8
Açúcares totais	54,1-89,9
Água	15-20
Minerais	0,1-0,5
Aminoácidos e proteínas	0,2-0,4
Ácidos orgânicos	0,2-0,8
pH	3,5-4,5

### **2.1.2. Mercado Brasileiro**

O Brasil é o 9º país no ranking de exportação de mel de abelhas, tendo exportado em 2017, 24.998 toneladas, para países como Estados Unidos e Canadá, somando um total de R\$ 112,722 milhões em receita cambial. No mesmo ano foram produzidos cerca de 41,6 mil toneladas de mel, apresentando um aumento de 5% em relação a 2016. Dentre os estados produtores, destacam-se as regiões Sul (17.145 toneladas) e Nordeste (10.391 toneladas), com o Rio Grande do Sul sendo responsável por 15,2% de toda a produção anual (IBGE, 2017 - [sidra.ibge.gov.br](http://sidra.ibge.gov.br)).

No Estado do Paraná, a produção de mel cresceu 102,67% de 2001 a 2017, atingindo 5,92 mil toneladas, chegando à posição de segundo maior estado produtor do país. Esse crescimento, observado no Paraná e no Brasil se deve às tecnologias de manejo e regulamentações do Ministério da Agricultura, maior expansão do mercado consumidor e estudos genéticos como por exemplo o manejo de rainhas, que em determinadas condições propiciam o aumento da produtividade dos apiários (Kowalski, 2018). A apicultura paranaense e nacional ainda enfrenta problemas como a falta de apoio governamental e fraudes no produto final.

## 2.2. O Hidromel

Hidromel é, baseado no decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009, uma bebida alcoólica produzida pela fermentação de uma solução de mel de abelhas, sais nutrientes e água potável, com graduação alcoólica entre 4 e 14% em volume, a 20 °C (Brasil, 2009). Entretanto, o hidromel é considerado uma bebida milenar, participando da história de diversos povos ao redor do mundo.

### 2.2.1. Histórico

Acredita-se que os primeiros sinais de produção e consumo de hidromel no mundo estejam relacionados ao período Paleolítico. Através de pinturas rupestres foi possível observar representações de caçadas em que os homens encontravam colmeias e coletavam o mel (Figura 1), guardando-o em bolsas feitas a partir de órgãos digestores de animais, como estômagos. Após o período de caçada, que muitas vezes era longo e os homens se submetiam a adversidades de clima, ao retornar percebiam a diferença no palato que o mel sofria, este submetido à chuva e o armazenamento. Dessa maneira, as primeiras fermentações poderiam ter ocorrido nessas bolsas, sendo consumidas principalmente pelas mulheres e outros homens que aguardavam as caçadas e coletas (Schramm, 2003).



**Figura 1 – Gravura em pedra de hominídeo coletando mel de uma colmeia em Zimbábue. (Fonte: [www.ibra.org.uk](http://www.ibra.org.uk))**

Posteriormente, Gregos e Egípcios utilizaram o mel como principal adoçante em suas sociedades. Nessa época, as primeiras técnicas de coleta de mel de abelhas começavam a surgir, evitando a destruição das colmeias. Entretanto, ainda não há consenso de que esses povos já domesticavam as abelhas, de forma similar à apicultura atual. Esses povos, já descobridores e produtores de vinhos e outras bebidas alcoólicas, usavam o mel em diversas

vezes sobre sua mesa, atrelando ao hidromel os dizeres de “ambrosia” e “néctar dos deuses”.

Pelo mediterrâneo, os romanos e gregos instruíram os primeiros usos de ervas e especiarias na culinária. Uma bebida chamada *Meddygllyn*, que significava “licor medicinal” era um fermentado de mel de abelhas e ervas, utilizado com fins medicinais. O termo *Metheglyn*, ainda utilizado hoje no mundo para designar hidroméis que utilizem ervas e especiarias, é derivado do antigo termo aqui mencionado (Schramm, 2003).

Do período pré-romano até a Renascença, há diversos poemas e documentos que referenciam o uso do hidromel pela Europa. O poema épico *Beowulf* salienta o uso e distribuição do hidromel pelas culturas nórdicas após a queda do império romano. Nele, muitas celebrações de vitórias, alianças e até morte de soldados eram celebrados com grandes quantidades de hidromel. Essas referências demonstram o quão sagrado o hidromel se tornou nesse período, principalmente devido à falta de entendimento dos povos em relação ao mel das abelhas e a fermentação em si. Para eles, tudo isso era mágico (Schramm, 2003).

Diversos monastérios pela Europa foram responsáveis pela produção de velas, utilizando a cera das abelhas. Essa atividade realizada pelos monges, originou a produção de mel e hidromel da forma mais tradicional, que se tornou o berço da apicultura moderna. Porém, no período de 1.000 à 1400 D.C., o hidromel sofreu um período de declínio, forçado pela competição com outras bebidas a partir de matérias-primas mais fáceis de cultivar, como os vinhos a partir das uvas, as sidras a partir das maçãs e das pêras dos Francos e o advento da cana-de-açúcar, possibilitando adoçar sem o uso de mel. A partir disso, com exceção de locais tradicionais como a África e a Polônia, o hidromel ficou restringido apenas a poucos locais de produção e alguns apiários (Schramm, 2003).

Com o início da década de 1980, diversos produtores artesanais de cerveja começaram a surgir, principalmente nos Estados Unidos. Essas pessoas, frustradas com a falta de opções das grandes cervejarias, perceberam que era possível produzir bebidas de qualidade dentro de suas próprias casas,

através de equipamentos simples e pouca quantidade de insumos (Bortolin, 2019). Seguindo a mesma tendência, nas últimas décadas esse movimento chegou ao Brasil. Junto aos cervejeiros locais, surgiram os pequenos produtores de hidromel, vinhos, sidras e outras bebidas. No ano de 2018 foi lançado o livro intitulado “O Guia do Hidromel Artesanal”, de Luís Felipe de Moraes, tornando-se o primeiro material brasileiro do tema. Em março de 2019 o livro esteve no top 100 de livros de ciências do site da Amazon (de Moraes, 2018).

### **2.2.2. Mercado**

Países como Lituânia, Polônia, Finlândia e Etiópia, por exemplo, são muito tradicionais no hidromel. Ao longo de toda a história de declínio e ascensão, esses países não diminuíram significativamente seu apreço pela bebida. Na Polônia por exemplo, o hidromel é parte da culinária local. O hidromel produzido na Etiópia, o *Tej*, é usualmente produzido de forma artesanal, podendo conter ervas, raízes e outras fontes açucaradas, que contribuam com aroma, sabor e posterior conteúdo alcoólico (Bahiru, Mehari & Ashenafi, 2006). Entretanto, a expansão contemporânea da bebida se deu nos Estados Unidos, que apresentou um aumento de 50 hidromelarias em 2011 para 510 em 2017 (Peligrini, 2019). Esse aumento se deu principalmente pela influência dos “millenials”, que buscam o consumo de bebidas artesanais e locais. A legislação americana de abertura de indústrias produtoras de hidromel, facilita a expansão nos Estados Unidos, abrindo o mercado consumidor interno.

Em um estudo referente ao ano de 2017 da *American’s Mead-Makers Association*, uma indústria de hidromel é aberta nos Estados Unidos a cada 3 dias, enquanto que no resto do mundo a média é de 7. Os estilos mais vendidos no mesmo ano foram os meloméis e os hidroméis tradicionais, correspondendo à 48% do total de estilos produzidos. Desse total, 71% foram vendidos em *tap room’s* locais, produzidos com 81% de méis locais. Esses números condizem com dados do mercado cervejeiro americano (Bortolini, 2019), demonstrando regionalidade no fornecimento e venda.

No Brasil não há cultura hidromeleira como no resto do mundo, porém ao longo da última década ocorreu um forte crescimento de produtores artesanais e profissionais. A legislação brasileira, extremamente restritiva, considera como

hidromel apenas o fermentado de mel de abelhas, sais nutrientes, água potável e fermento. O uso de adjuntos caracteriza uma bebida fermentada mista (Brasil, 2009). Entretanto, nos últimos anos cresceu o número de produtores artesanais, além de registros no Ministério da Agricultura (MAPA) para a produção e comercialização da bebida. Segundo um estudo informal da Old Pony Meadery realizado em 2019, o Brasil obteve 11 registros MAPA e aproximadamente 5 hidromelarias registradas no país nos últimos 10 anos. Marcas como Old Pony e Valkyria já começam a tomar conta do gosto do consumidor. Em 2018 um levantamento nas redes sociais apontou cerca de 127 produtores hidromel, estando profissionais incluídos nesse número. No mesmo ano, foi publicado o primeiro livro brasileiro sobre o assunto (de Moraes, 2018). Apesar do número crescente de produtores, os entraves da legislação e tributação no Brasil ainda impedem que os brasileiros tenham números similares aos observados nos Estados Unidos.

O hidromel, contudo, é uma maneira de agregar valor à apicultura, transformando o mel em um produto de maior valor agregado. O país, que possui a maior variedade de flora do mundo, tem potencial para alta complexidade de hidroméis, visto que méis de variados tipos, cores e sabores podem ser matéria-prima.

### **2.2.3. Processo de produção**

O processo de produção de hidromel é milenar, e relativamente simples. Até o período de ascensão da bebida, não havia padronização nem técnicas adequadas para sua produção. Com o movimento da cerveja artesanal ganhando força, necessitou-se de material específico, para a padronização das técnicas de produção. Em 2003 foi publicado o livro *“The Complete Meadmaker”* de Ken Schramm, que reúne informações a respeito dos principais aspectos a serem considerados na produção do hidromel, como sanitização de equipamentos, adição de adjuntos e clarificação e envase. Posterior à sua publicação, novos estudos foram realizados e determinadas técnicas foram revistas, principalmente devido aos avanços tecnológicos em enologia. Em 2014 foi publicado o livro *“The Complete Guide to Making Mead”* de Steve Piatz, que tornou-se uma revisão da publicação de Schramm, alterando técnicas como a forma de adição de nutrientes e a ausência de fervura do mosto. Em 2016 o



órgão certificador americano de cervejas, hidroméis e sidras, o *Beer Judge Certification Program* (BJCP) definiu as diretrizes técnicas de hidromel, separando-os em categorias de acordo com características como teor alcoólico, dulçor e carbonatação. De maneira genérica, a produção de hidromel se divide em preparo do mosto, fermentação, clarificação e maturação e envase.

### 2.2.3.1. Preparo do mosto

O mosto de hidromel é composto por uma solução de mel suplementada, posteriormente adicionado o fermento. A escolha do mel utilizado, geralmente está de acordo com a receita na qual o produtor se interessa. A diversidade de méis possibilita a produção de hidroméis muito particulares, desde aromas delicados como dos méis de laranjeira até os mais fortes oriundos dos méis de eucalipto. A proporção mel/água de cada receita está de acordo com o teor alcoólico previamente definido, pois quanto maior a concentração de açúcares, dentro dos limites de tolerância das leveduras, maior a concentração final de álcool. Entretanto, a concentração de açúcares, varia de mel para mel. Na Polônia, por exemplo, há uma relação empírica de produção de hidromel a partir da quantidade de mel utilizada (Tabela 2).

**Tabela 2 – Proporção mel/água na produção de hidromel na Polônia. (EUR-Lex, 2012)**

Nome	Proporção mel- água	Teor alcoólico (% ABV)	Dulçor
<b><i>Czwórniak</i></b>	1:3	9-12	Seco
<b><i>Trójniak</i></b>	1:2	12-15	Demi-seco
<b><i>Dwójniak</i></b>	1:1	15-18	Suave
<b><i>Półtorak</i></b>	1:0,5	15-18	Doce (Sobremesa)

As quantidades descritas na Tabela 2 são utilizadas de forma empírica pelos poloneses, e não são comercializadas devido à restrições legais.

As técnicas tradicionais de produção de hidromel recomendavam a fervura, ou aquecimento do mosto de hidromel prévio à fermentação, como forma de esterilização e mais rapidez no processo de clarificação (Schramm, 2003).

Alguns autores estudaram o tratamento térmico do mosto de hidromel, identificando um aumento na concentração de 5-hidroximetilfurfural (HMF), importante parâmetro de qualidade em méis e a diminuição de compostos antioxidantes (Kahoun, Rezková & Královsky, 2017) (Czabaj *et al.*, 2017). Além disso, percebeu-se sensorialmente a perda de aromas do mel quando havia o processo de pré-aquecimento, sendo não mais recomendada por Piatz (2014).

A legislação brasileira vigente estabelece que o hidromel é produzido apenas com água, sais nutrientes, mel e fermento. Entretanto, o hidromel é classificado em estilos diferentes de acordo com ingredientes adjuntos os quais são incluídos, como frutas, sucos de frutas, especiarias, ervas e vegetais (PIATZ, 2014).

O hidromel produzido com frutas ou suco de frutas, por exemplo, é chamado de Melomel. Hidromel com especiarias, *metheglyn* ou *metheglin*, tendo classificações variadas de acordo com o adjunto empregado. Recentemente hidroméis com frutas e especiarias tornaram-se objetivo de estudo, como a adição de polpas de cajá, tamarindo e suco de laranjas (Alencar *et al.*, 2017)(Anunciação *et al.*, 2017)(Souza, Dias & Teixeira, 2018). Kawa-Rygielska *et al.* (2019) demonstraram que a adição de sementes de uvas se relacionaram positivamente com o conteúdo final de álcool, além da concentração de polifenóis. Amorim *et al.* (2018) avaliaram a concentração de polpa de acerola na produção de hidromel e observaram um aumento significativo no crescimento celular e na produção de etanol (16,6% v/v), sugerindo que a concentração de polpa aumentou a tolerância alcoólica da levedura *S. cerevisiae* AWRI 976.

#### **2.2.3.2. Suplementação Nutricional**

O mosto de hidromel é caracterizado por apresentar um lento processo fermentativo, conforme relatado por diversos autores (Sroka & Satora, 2017) (Iglesias *et al.*, 2014) (Gomes *et al.*, 2013). O baixo pH, o pouco conteúdo mineral e de nitrogênio disponível, as altas concentrações de açúcares e a presença de inibidores do crescimento microbiano como o hidroximetilfurfural (HMF) e ácidos graxos anfílicos de cadeia média (MCFA) tornam o mosto de hidromel um ambiente de estresse para as leveduras. O mel, por sua vez, é uma

substância produzida pelas abelhas justamente para evitar fermentações e a degradação.

O baixo conteúdo mineral e de nitrogênio assimilável foi avaliado em mostos de vinho e hidromel. Mendes-Ferreira *et al.* (2010) utilizaram tartarato de potássio, ácido málico e fosfato diamônio (DAP), avaliando a suplementação com ácidos orgânicos e compostos nitrogenados no mosto de hidromel. A produção de compostos aromáticos foi positivamente influenciada pela concentração de DAP, assim como o tempo de fermentação foi menor. Gomes *et al.* (2013) observaram relações positivas entre a concentração de nutrientes no mosto de hidromel e a produção de etanol inclusive de maior influência do que a temperatura de fermentação, porém altas concentrações de nutrientes demonstraram efeitos negativos na produção de etanol e glicerol. Para mostos de vinho, a deficiência de nitrogênio assimilável, apresenta baixas velocidades de fermentação durante todo o processo fermentativo, limitando o crescimento microbiano (Bateyron & Sablayrolles, 2001). Fairbairn *et al.* (2017), sob o estudo de um mosto sintético de vinho, obtiveram relações positivas entre a concentração de aminoácidos livres e sulfato de amônio utilizados simultaneamente, com a produção de substâncias voláteis durante a fermentação. Barbosa *et al.* (2009) testaram a influência do momento de adição de nutrição nitrogenada e sua influência. Observou-se que a adição conjunta de DAP e uma mistura de aminoácidos no início da fermentação proporcionou uma maior produção de etanol, enquanto a adição no início da fase estacionária diminuiu a produção de etanol e ácido acético, favorecendo a síntese de compostos aromáticos como 2-feniletanol, etil isobutirato, 2-feniletil acetato e etil propionato.

Piatz (2014) e BJCP (2016) recomendam a técnica de adição de nutrientes comerciais em etapas, fracionando o nutriente total e dosando-o ao longo de toda a fermentação. A partir de então, diversos nutrientes comerciais surgiram, com o intuito de evitar entraves durante a fermentação. Alguns nutrientes são utilizados com protetores da reidratação de leveduras liofilizadas e outros como suplementos da deficiência de nitrogênio e outros micronutrientes. Os principais nutrientes comerciais para vinhos e hidroméis estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 – Nutrientes comerciais para vinhos e hidroméis. (adaptado de LallemandWine®)**

<b>Nome comercial</b>	<b>Usado para</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Composição básica</b>
<b>Fermaid A</b>	Nutrição básica necessária	1/3 do tempo total de fermentação (20-40 g/hL)	Levedura hidrolisada + fosfato diamônio
<b>Fermaid K™</b>	Assegurar fermentação completa e cinética regular	Início e 1/3 do tempo total de fermentação	Levedura hidrolisada, fosfato diamônio, sulfato de magnésio, tiamina, ácido fólico e biotina)
<b>Fermaid O™</b>	Recomendado para baixas e moderadas deficiências de nitrogênio. Recomendado para produtores orgânicos	Início e 1/3 do tempo total de fermentação	Levedura hidrolisada rica em aminoácidos assimiláveis
<b>Go-Ferm</b>	Micronutriente para leveduras	Utilizado na reidratação	Levedura hidrolisada rica em minerais
<b>Go-Ferm Protect</b>	Utilizado para proteção ao choque osmótico e mais tolerância ao álcool	Utilizado na reidratação	Levedura hidrolisada rica em esteróis

A maioria dos nutrientes comerciais são suplementos à base de aminoácidos (fonte orgânica de nitrogênio), sais de amônio (fontes inorgânicas de nitrogênio) e leveduras hidrolisadas, contendo a necessidade nutricional para

o crescimento celular. Baseando-se nesse contexto, muitos outros nutrientes podem ser desenvolvidos, com matéria-primas diferentes.

### **2.2.3.3. Fermentos**

As bebidas alcoólicas de maneira geral, e até as usinas de produção de etanol utilizam cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algumas bebidas também utilizam cepas de *Saccharomyces bayanus*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces* (Gschaedler, 2017). As diferentes cepas têm como principal objetivo obter diferentes perfis, no que se refere à necessidade de suplementação, perfil de consumo de açúcares e características distintas na produção de etanol, glicerol e outras substâncias como ésteres e álcoois superiores, gerando complexidade à bebida final (Lallemand, 2019).

Convencionalmente o hidromel é produzido comercialmente com cepas comerciais de vinhos, com poucas cepas específicas no mercado. Na Tabela 4 estão apresentados os principais fermentos utilizados em vinhos, estes também utilizados para a produção de hidromel, e suas principais características.

**Tabela 4 – Principais fermentos utilizados na produção de hidromel. (Adaptado de PIATZ, 2014)**

<b>Código do fermento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Faixa de temperatura de trabalho (°C)</b>	<b>Tolerância alcoólica (% ABV)</b>	<b>Características principais</b>
<b>ICV-K1 (V 1116)</b>	Lallemand	10-36	18	Abaixo de 16 °C produz ésteres florais como isoamil acetato e feniletil acetato
<b>EC-1118</b>	Lallemand	10-30	18	Tolera faixas de pH de 3,7 à 7,0. Em baixas concentrações de nutrientes produz consideráveis quantias de SO <sub>2</sub> (até 50 ppm).
<b>ICV D47</b>	Lallemand	15-30	14	Produz aromas frutados e cítricos. Acentua características de frutas.
<b>RC 212</b>	Lallemand	18-30	16	Conhecida por produzir vinhos tintos com corpo. Produz características de frutas como cerejas e aromas de especiarias.
<b>Pasteur Champagne</b>	Red Star	15-30	14	Cepa considerada neutra. Não produz aromas característicos de fermentos.
<b>Pasteur Red</b>	Red Star	18-30	16	Cepa clássica para vinhos tintos
<b>WLP750</b>	White Labs	16-32	17	Tolera baixas temperaturas de fermentação (10-16 °C)

Ainda que utilizadas de forma correta, as condições do mosto de hidromel ainda fornecem condições de estresse para leveduras comerciais de vinhos. Nesse contexto, alguns autores avaliaram parâmetros fermentativos no uso de cepas comerciais, cepas de panificação e isolamento de leveduras na produção de hidromel. Gomes *et al.* (2013), em um estudo de otimização, avaliaram a temperatura e a concentração de nutrientes como fatores de influência na produção de hidromel com a levedura comercial PB2002 da Fermol®. Na temperatura de 24 °C e concentração de nutriente comercial Enovit, obtiveram menores concentrações de açúcares residuais e ácido acético e maiores concentrações de etanol e glicerol. Pereira *et al.* (2013) avaliaram a concentração inicial de células dos fermentos comerciais ICV D47 e QA23, obtendo perfis semelhantes na produção de compostos precursores de aromas como etil hexanoato e isoamil acetato, positivamente influenciados pela menor quantidade de inóculos ( $10^5$  UFC/mL). Entretanto, a levedura ICV D47 apresentou as mesmas características em uma concentração maior ( $10^6$  UFC/mL), demonstrando a diferença de perfis entre diferentes cepas. Mileski (2016) observou que a levedura de panificação apresentou menor capacidade de conversão de açúcares em etanol em um mosto de hidromel, porém produziu concentrações de ésteres precursores de aromas frutados e florais similares aos produzidos em condições semelhantes para leveduras comerciais EC 1118 e Red Star Champagne.

Células de leveduras isoladas também foram utilizadas na produção de hidromel. Pereira *et al.* (2014) observaram uma maior produção de compostos voláteis, desejados (etil hexanoato e etil octanoato) e indesejados (4-vinilfenol e 4-finilguaiacol) quando leveduras comerciais ICV D47 e QA23 foram imobilizadas em matrizes de alginato de Cálcio. A produção de etanol e glicerol se mostrou menor em comparação à fermentação com células livres. Os trabalhos de Qureshi & Tamhane (1985) e (1987) avaliaram o consumo de açúcares e a produção de etanol e etil acetato utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula anomala*. As células imobilizadas promoveram processos contínuos de produção de hidromel, porém não foi avaliada a produção de álcoois superiores, por exemplo, que em grandes concentrações necessitariam de mais tempo de maturação.

Isolamento e seleção de cepas buscam a obtenção de leveduras específicas, adaptadas às condições do mosto de hidromel. O estudo de Liu *et al.* (2016) demonstrou que leveduras *Zygosaccharomyces mellis* isoladas de amostras de mel possuíam alta tolerância às condições antimicrobianas de sua origem. As leveduras toleraram concentrações da ordem de 500 à 700 g.L<sup>-1</sup> em açúcares redutores e pH da faixa de 2,5 à 7,5. Mileski (2016) isolou microrganismos de produtos apícolas como mel e pólen, em condições de 20% m/v de glicose e 5% m/v de etanol. As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* isoladas produziram alto potencial na produção de bebidas alcoólicas, com baixa produção de substâncias indesejadas como ácido acético e metanol.

#### **2.2.3.4. Clarificação e Maturação**

O hidromel pós fermentado é recomendado por autores como Piatz (2014) e Schramm (2003), que esteja com devida clarificação, translúcido e brilhante, como parâmetro de qualidade. A bebida clarificada representa a ausência de leveduras em suspensão, particulados do mel não solúveis como proteínas e cera de abelhas, e até de adjuntos como nutrientes e derivados de frutas e especiarias (Pereira *et al.*, 2013). A turbidez pode ser retirada através de duas maneiras: naturalmente, pela ação de substâncias flocculantes da própria bebida que ao longo do tempo sedimentam, e através do uso de agentes clarificantes, que tem a finalidade de forçar a sedimentação dos particulados (de Moraes, 2018).

No mercado existem diversos compostos clarificantes disponíveis, e dentre eles podemos citar os apresentados na Tabela 5.



**Tabela 5 – Principais agentes clarificantes comerciais para vinhos e hidroméis. (Adaptado de Pascoal *et al.*, 2017)**

<b>Agente clarificante</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Fonte</b>	<b>Forma</b>	<b>Dosagem</b>
Bentonita	Bentogran®	Argila fina à base de silicato de alumínio	Pó	10-40 g.hL <sup>-1</sup>
Albumina	Ovogel®	Proteína principal de ovos	Pó	5-10 g.hL <sup>-1</sup>
Gelatina	Gelsol®	Proteína animal (colágeno)	Líquida	5-100 mL.hL <sup>-1</sup>
Sílica	Spindasol®	Componente principal da areia, vidros e quartzo	Líquida	50-100 mL.hL <sup>-1</sup>

As dosagens recomendadas pelos fabricante indicam a quantidade de compostos a serem sedimentados, que varia de acordo com o hidromel produzido. Nesse contexto, a influência dos agentes clarificantes na bebida final foi avaliada por alguns autores. Em vinhos Cabernet Sauvignon observou-se elevado efeito da Bentonita na cor (-5%) e pequeno efeito na extração de polifenóis (-4%), demonstrando a mudança de composição em uma bebida final quando são aplicados agentes clarificantes (Ghanem *et al.*, 2017). Para hidroméis, os estudos de Pascoal *et al.* (2017) e Pascoal *et al.* (2019) demonstraram agentes clarificantes à base de taninos como os principais removedores de compostos voláteis, em contrapartida com a sílica, agente mais inerte aos compostos em questão. A análise sensorial confirmou a preferência pelas amostras clarificadas com sílica e um conjunto de clarificantes (bentonita + gelatina + albumina + sílica).

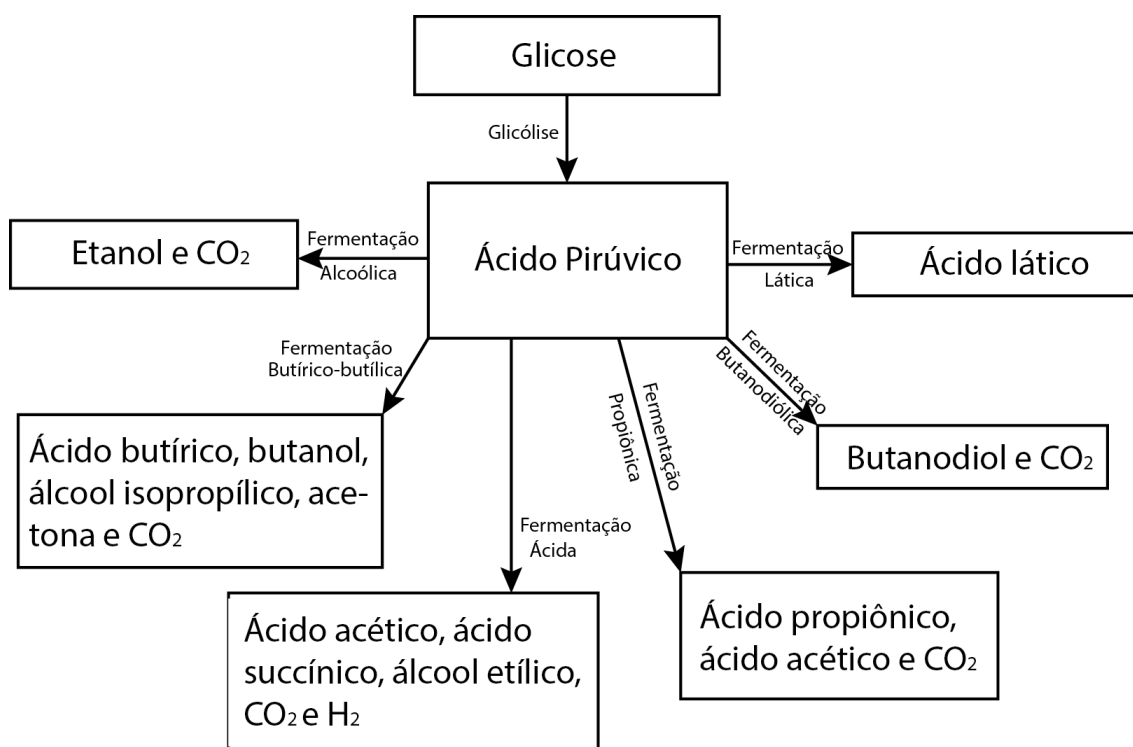
O processo de maturação é uma etapa importante na produção de bebidas. Nessa etapa, ocorrem diversas reações químicas que impactam diretamente no perfil sensorial da bebida final, estas dependentes de diversos fatores como concentração de compostos voláteis, oxigênio, pH, acidez, minerais, e até de fatores externos como temperatura, tipo e dimensões do recipiente de maturação, umidade e luminosidade (Agazzi *et al.*, 2018). A

redução da acidez pela transformação dos ácidos orgânicos e a diminuição de acetaldéido são consequências da maturação (Mileski, 2016).

A maturação ainda pode ser realizada em recipientes que permitam alterações na bebida final através de trocas gasosas e/ou da incorporação de substâncias contidas nas paredes do recipiente. Ânforas e barris de madeira, por exemplo, são materiais porosos, que permitem pequenas concentrações de oxigênio de entrarem e lentamente reagirem, absorvendo e liberando compostos no meio (Baiano & Varva, 2019).

### **2.3. Processos Fermentativos**

Com objetivo de compreender o modo como os microrganismos de interesse convertem nutrientes em produtos e biomassa, modelos foram adotados e validados através de observações experimentais. Como descrito por Hiss (2013), a cinética de fermentações é reduzida a um conjunto de reações enzimáticas no interior da célula. Essas reações, variam de acordo com o metabolismo do microrganismo (genética), que determinadas condições podem se tornar precursoras de determinadas vias metabólicas. As principais rotas metabólicas e seus produtos estão apresentadas na Figura 2.

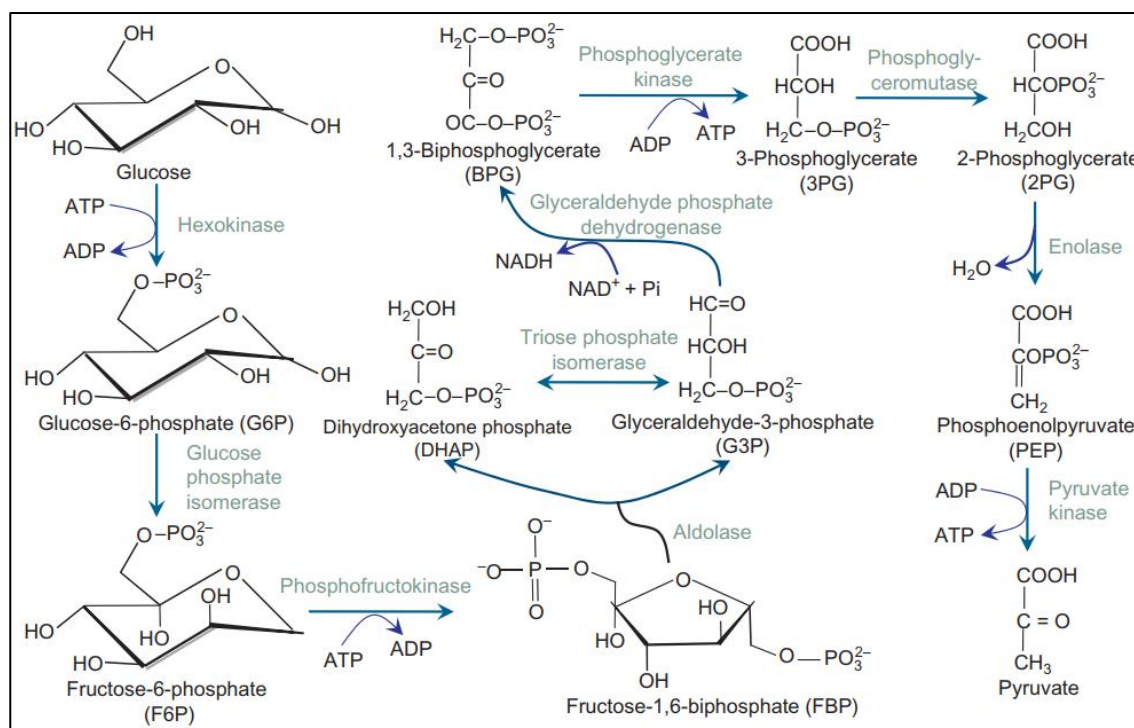


**Figura 2 - Rotas metabólicas dentre os microrganismos. Adaptado de El-Mansi et al. (2011)**

### 2.3.1. Glicólise

Os microrganismos, de forma geral, necessitam de nutrientes disponíveis para seu crescimento. Esses nutrientes são divididos em fontes de carbono, fontes de energia, fonte de nitrogênio, minerais e vitaminas. A mais comum fonte de carbono e energia é a glicose, porém são também utilizados pelas células a maltose, a sacarose, as dextrinas, ácidos orgânicos, glicerol, entre outras (Nielsen, Villadsen & Lidén, 2002).

A maioria dos açúcares é convertida em Glicose-6-fosfato (G6P) ou Frutose-6-fosfato (F6P) antes de serem metabolizadas, que intracelularmente se isomerizam em equilíbrio. Contudo, G6P é o principal ponto de partida das rotas metabólicas, sendo produzido pelo mecanismo de transporte ou como resultado da glicose intracelular em reação acoplada à hidrólise de ATP. A glicólise, é então definida como sendo a soma de todos os passos da glicose (ou G6P) convertida em piruvato. A glicólise é demonstrada na Figura 3.



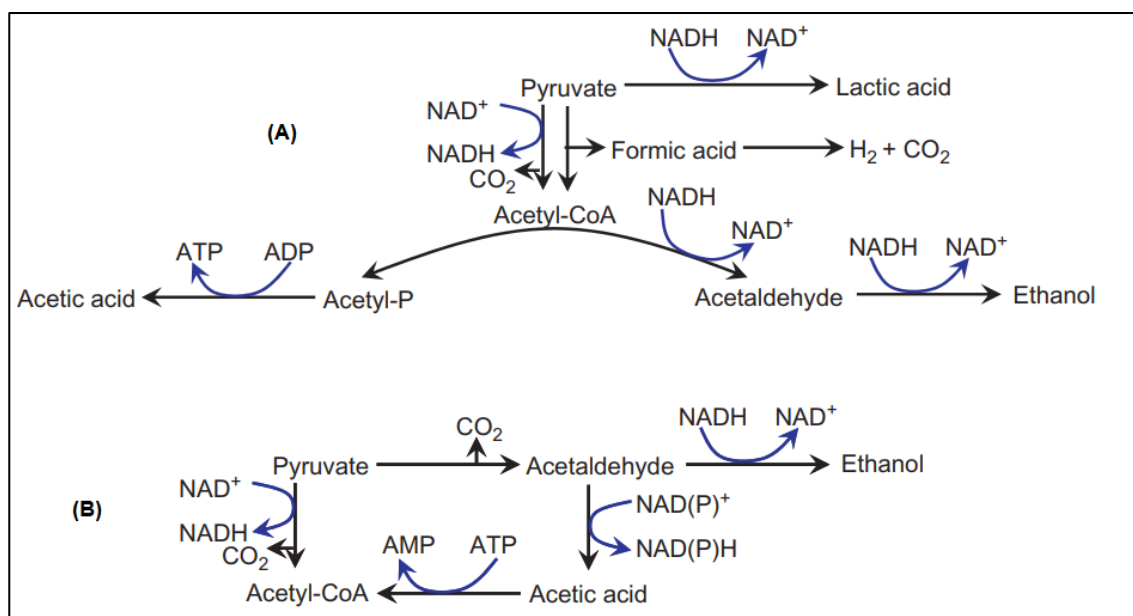
**Figura 3 - Biorreações envolvidas na conversão da glicose em piruvato pela via glicolítica. Fonte: Liu, 2016.**

A glicólise leva à transformação da glicose em duas moléculas de piruvato, sendo assistida em todos os passos por enzimas específicas. O piruvato então, sob condições anaeróbicas, pode ser convertido em ácido láctico, etanol, acetona, butanol e ácido acético. Assim, define-se que a conversão anaeróbica da glicose é chamada de fermentação. Entretanto, o termo é usado em uma vasta quantidade de processos envolvendo microrganismo e enzimas (Liu, 2016).

### 2.3.2. Metabolismo Fermentativo

Liu (2016) define o metabolismo fermentativo como sendo os processos em que, na ausência de oxigênio, a fosforilação oxidativa está inativa. As moléculas de NADH se acumulam dentro das células, sendo necessária a redução do piruvato para acetato, ácido láctico ou etanol. Esse metabolismo não é o mesmo para todos os microrganismos mas possuem similaridades.

Na Figura 4 estão apresentadas o metabolismo fermentativo de bactérias e leveduras. Apesar do exposto acima, outros subprodutos são produzidos pelos microrganismos, mas nesse trabalho serão discutidos apenas os subprodutos do crescimento anaeróbico das leveduras, na seção 2.4.



**Figura 4 - Metabolismo fermentativo para bactérias (A) e leveduras (B). Fonte: Liu, 2016**

### 2.3.3. Cinética de Fermentações

O estudo cinético das fermentações envolve geralmente mudanças em valores de concentração de biomassa (ou número de microrganismos) ( $X$ ), nutrientes ou substratos ( $S$ ), e produtos ( $P$ ). Observando-se o comportamento do crescimento microbiano ( $X(t)$ ), do consumo do substrato limitante ( $S(t)$ ) e da formação dos produtos ( $P(t)$ ), pode-se estabelecer considerações sobre o processo fermentativo, determinar velocidades de crescimento e relacioná-la com as demais variáveis ao longo do processo (Schmidell *et al.*, 2001).

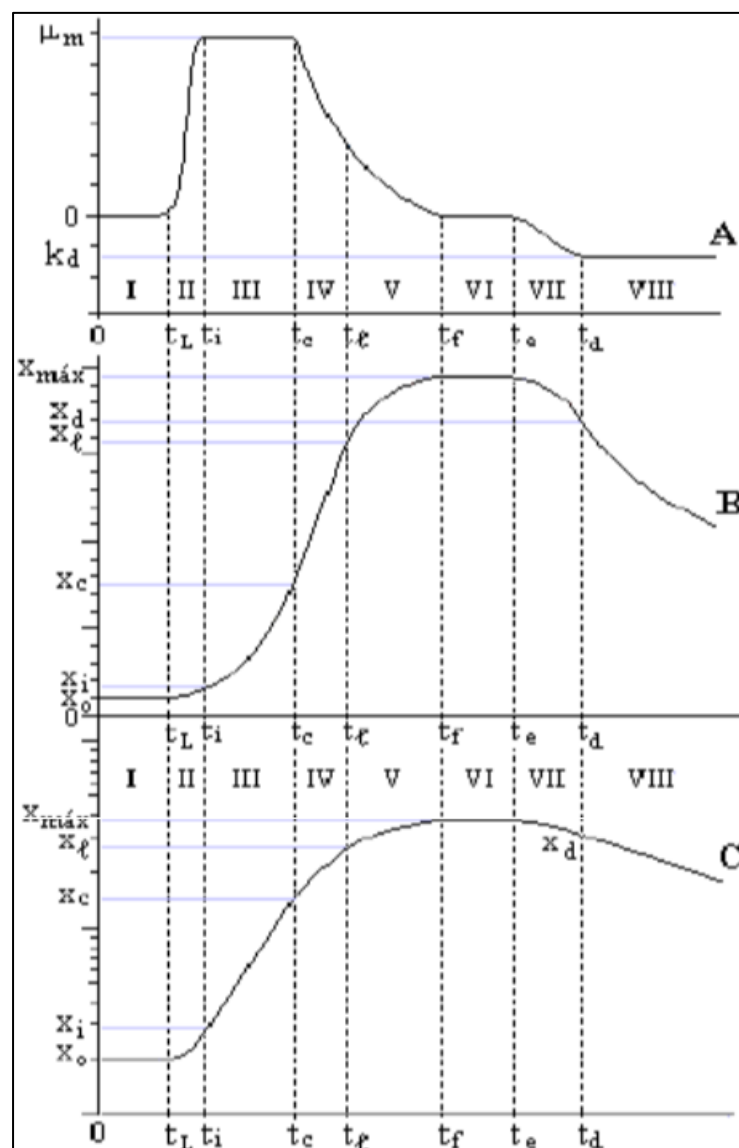
#### 2.3.3.1. Análise do Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano, segundo Hiss (2013), é o aumento da massa e do número de micro-organismos, passado um determinado tempo de cultivo. Considerando um cultivo com uma quantidade inicial de células  $X_0$ , e transcorrido um determinado tempo  $t$ , pode-se introduzir o conceito de velocidade específica de crescimento através da Equação 01.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 01})$$

Se as condições experimentais forem constantes e controladas, o crescimento microbiano obedece à Lei exponencial de crescimento, que pode

ser observada na Figura 5 para o cultivo descontínuo (Hiss, 2013). Caso haja a falta de algum componente essencial ao crescimento, desde o início do cultivo, essa Lei pode não ser verificada. Ela é válida para todos os microrganismos procarióticos e eucarióticos, que definem uma fase exponencial de crescimento (Figura 6 – Fase III), ou seja, que baseando-se na Equação 01 definem velocidade específica constante de crescimento.



**Figura 5 - Velocidade específica de crescimento (A) e as fases da curva de crescimento microbiano em escala linear (B) e logarítmica (C). Fonte: Hiss, 2013**

As fases do crescimento microbiano em cultivo descontínuo, são:

- **Fase I – Fase “lag”**

Derivada do inglês, tem como significado “atraso” (Hiss, 2013). Durante essa fase ocorre adaptação das células ao novo ambiente em que foram inseridas. Dependendo da composição do meio, são necessárias novas enzimas, assim como outras antes em formação são interrompidas. Nessa fase a massa celular aumenta pouco, sem aumento na densidade do número de células (Liu, 2016).

- **Fase II – Fase de transição**

É a fase prévia à fase exponencial de crescimento. Alguns microrganismos exibem uma fase de transição maior e outros menor. Há um aumento gradual da velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ), sendo observado assim o crescimento microbiano propriamente dito (Schmidell *et al.*, 2001).

- **Fase III – Fase de crescimento exponencial**

Nessa fase há o crescimento exponencial de microrganismos, apresentando uma velocidade constante e máxima de crescimento, chamada de  $\mu_m$ . A duração dessa fase irá depender da presença de compostos limitantes no meio e do tempo de geração, que pode variar de microrganismo pra microrganismo. A produção de metabólitos secundários, inibidores, também podem causar o fim dessa fase (Hiss, 2013).

Utilizando a Equação 01 para essa situação, pode-se integrá-la para  $\mu_x = \mu_m = \text{constante e máxima}$ :

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu_m \int_0^t dt \quad (\text{Eq. 02})$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_m \cdot t \quad (\text{Eq. 03})$$

Dessa maneira, através de dados experimentais, pode-se definir uma fase exponencial de crescimento e usar uma regressão linear, como segue:

$$Y = aX + b \quad (\text{Eq. 04})$$

Em que:

- $Y = \ln X$ ;
- $a = \mu_m$ ;
- $X = t$ ;
- $b = \ln X_0$

- **Fase IV – Fase linear de crescimento**

Fase no qual o crescimento microbiano não apresenta velocidade constante. Devido à falta de determinados compostos como substratos ou nutrientes, e até oxigênio, podem causar uma desaceleração no crescimento com maiores velocidades de morte celular. Produtos inibidores também são responsáveis por esse comportamento. As condições do meio e o comportamento individual de cada espécie de microrganismo pode evitar a existência dessa fase, indo da Fase III para a Fase V (Hiss, 2013).

- **Fase V – Fase de desaceleração**

Nessa fase a composição e tamanho celular começam a mudar, devido à reestruturação necessária às células para a sobrevivência em um ambiente de falta de nutrientes ou toxicidade de compostos inibidores (Liu, 2016).

- **Fase VI – Fase estacionária**

A concentração de microrganismos atinge seu valor máximo e constante, denominado de  $X_{máx}$ . As velocidades de crescimento e de morte celular se balanceiam, mantendo um número constante de células viáveis (Hiss, 2013).

- **Fase VII – Fase de declínio ou lise**

A velocidade de morte celular ultrapassa a velocidade de crescimento microbiano, diminuindo conseqüentemente a concentração celular. Nessa fase há a autólise das células, ou seja, o rompimento das membranas devido à ação das enzimas intracelulares (Hiss, 2013).



- **Fase VIII – Fase de morte exponencial**

Nessa fase há morte celular exponencial. Praticamente deixa de existir crescimento microbiano, com extrema morte celular.

O conhecimento da curva de crescimento microbiano é de extrema importância no estudo da cinética de fermentações. Através dela torna-se possível prever o tempo para que o microrganismo atinja sua máxima concentração. No estudo das velocidades, principalmente na velocidade máxima de crescimento, observa-se os efeitos que as condições do meio têm sobre o microrganismo, assim como a determinação da influência de nutrientes, concentração de substrato e até de produtos inibidores no crescimento microbiano.

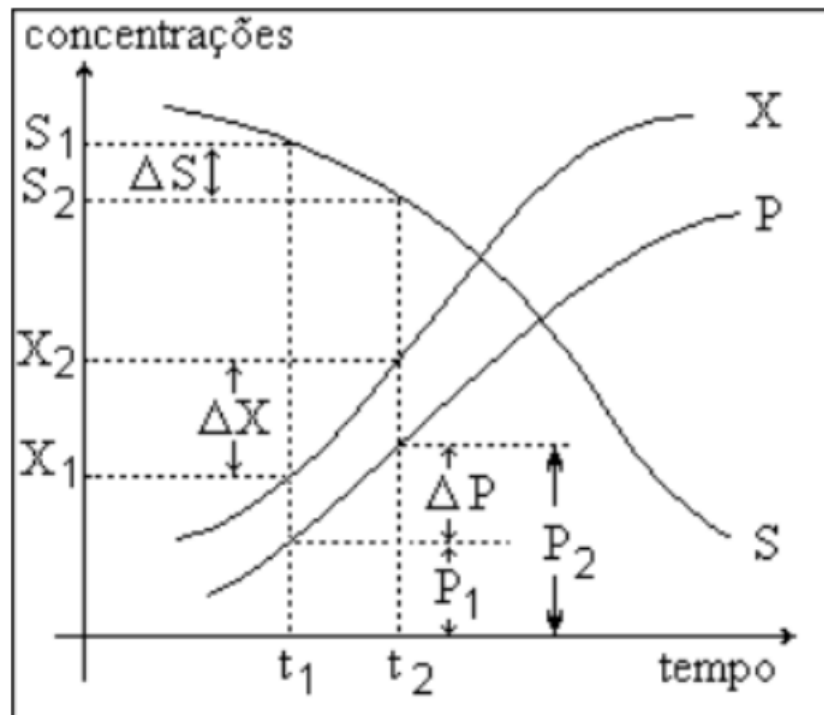
### **2.3.3.2. Análise do Consumo de Substrato e Formação de Produtos**

O substrato é uma substância de interesse, responsável pelo crescimento e formação de produtos por determinado microrganismo, muito das vezes relacionada à fonte de carbono que será oxidada (Hiss, 2013). Sua presença afeta diretamente o crescimento microbiano, que pode diminuir caso o substrato esteja em baixa quantidade ou em alta quantidade (inibição pelo substrato). A atividade microbiana tende a diminuir caso o substrato ou outros nutrientes estejam se esgotando.

Geralmente, no que se entende por fermentação, o consumo do substrato está intimamente relacionado à formação de um ou mais produtos de interesse. Na Figura 7 estão apresentadas curvas comuns para o consumo de determinado substrato, formação de produto e crescimento microbiano para determinado cultivo descontínuo. Assim como a Equação 01, podemos relacionar a variação dessas substâncias em determinado tempo, analogamente através das velocidades específicas de consumo de substrato (Equação 05) e de formação de produtos (Equação 06).

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (\text{Eq. 05})$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (\text{Eq. 06})$$



**Figura 6 - Curvas padrão para uma cinética de consumo de substrato por determinado microrganismo. Fonte: Hiss, 2013**

Na situação em que o crescimento do microrganismo causa a produção de determinado componente, sendo este um produto, pode-se relacionar o consumo de substrato com a formação do produto, de modo que:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 07})$$

A constante de proporcionalidade  $Y_{P/X}$  é chamada de fator de rendimento do produto em relação à biomassa formada. Tomando que o crescimento de biomassa está associado ao consumo de substrato, tem-se que:

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (\text{Eq. 08})$$

Dessa maneira, observa-se para as velocidades específicas:

$$\mu_P = Y_{P/X} \mu_X \quad (\text{Eq. 09})$$

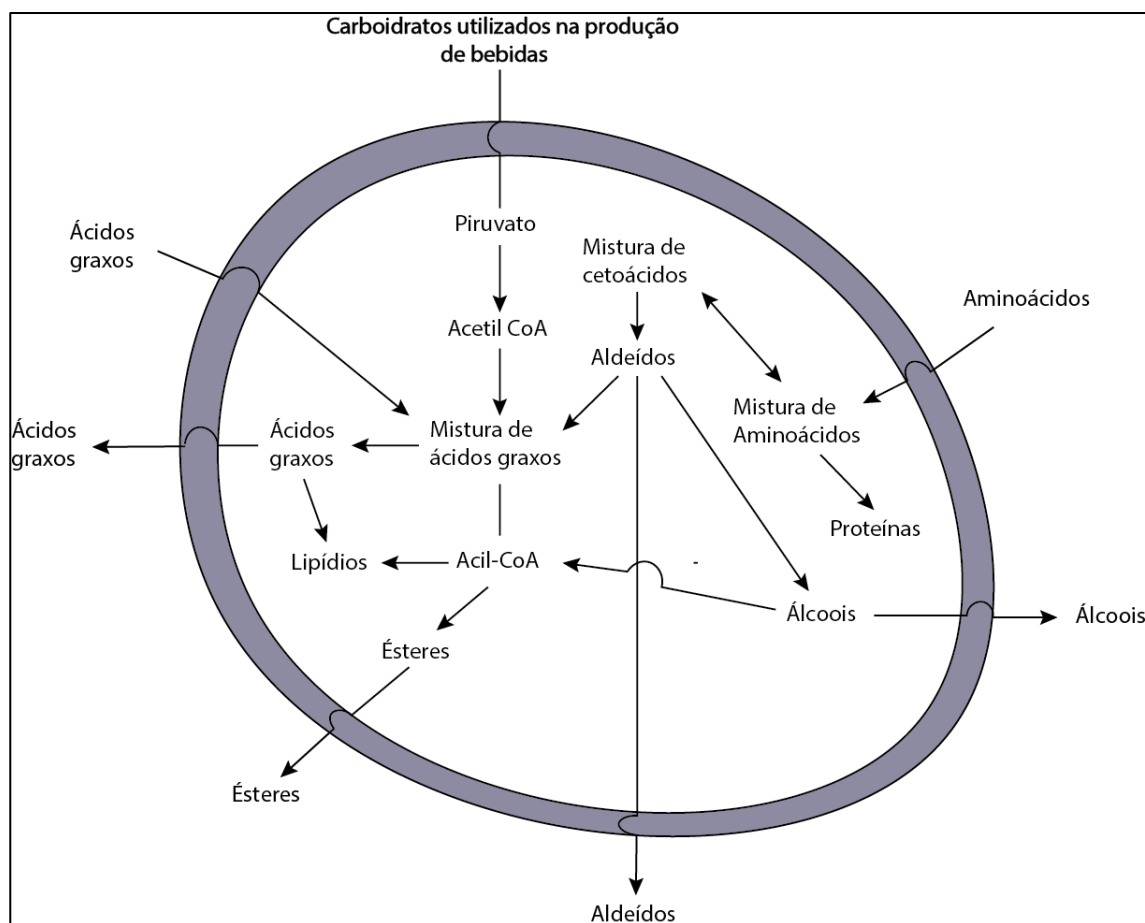
$$\mu_P = -Y_{P/S} \mu_S \quad (\text{Eq. 10})$$

Especificamente para a fermentação alcoólica, o rendimento  $Y_{P/S}$  é dado pela relação entre a massa de etanol formada e massa do substrato utilizado, corriqueiramente a glicose. Dessa maneira o rendimento teórico é dado por 0,511 g Etanol/g Glicose.

#### 2.4. Metabólitos Secundários

Durante os processos fermentativos, leveduras produzem compostos secundários, que geram atributos como aroma e sabor. A maioria desses compostos são álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres. Essas substâncias são consequência do metabolismo das próprias leveduras, porém espécies, cepas e outras diferenciações nesses organismos contribuem para tal produção. Além da escolha das cepas, fatores como pH, aeração, agitação e a natureza do substrato influenciam diretamente na produção de aromas. Essas substâncias, sempre foram atreladas às bebidas alcoólicas, pois estima-se cerca de 400 substâncias químicas diferentes relacionadas aos aromas de bebidas como cervejas, vinhos, saquês, e outras bebidas fermentadas. A combinação única de aromas e sabores das bebidas está relacionada a diversas substâncias, dentre elas ácidos orgânicos, ésteres, compostos carbonílicos, fenóis, compostos nitrogenados, sulfurosos e uma grande lista de álcoois (Abbas, 2006, p.285).

Na Figura 7 estão apresentadas as principais rotas metabólicas envolvidas na produção dos aromas por leveduras.



**Figura 7 - Principais rotas metabólicas envolvidas na produção de metabólitos por leveduras. Adaptado de Abbas, 2006, p. 285**

#### 2.4.1. Álcoois superiores

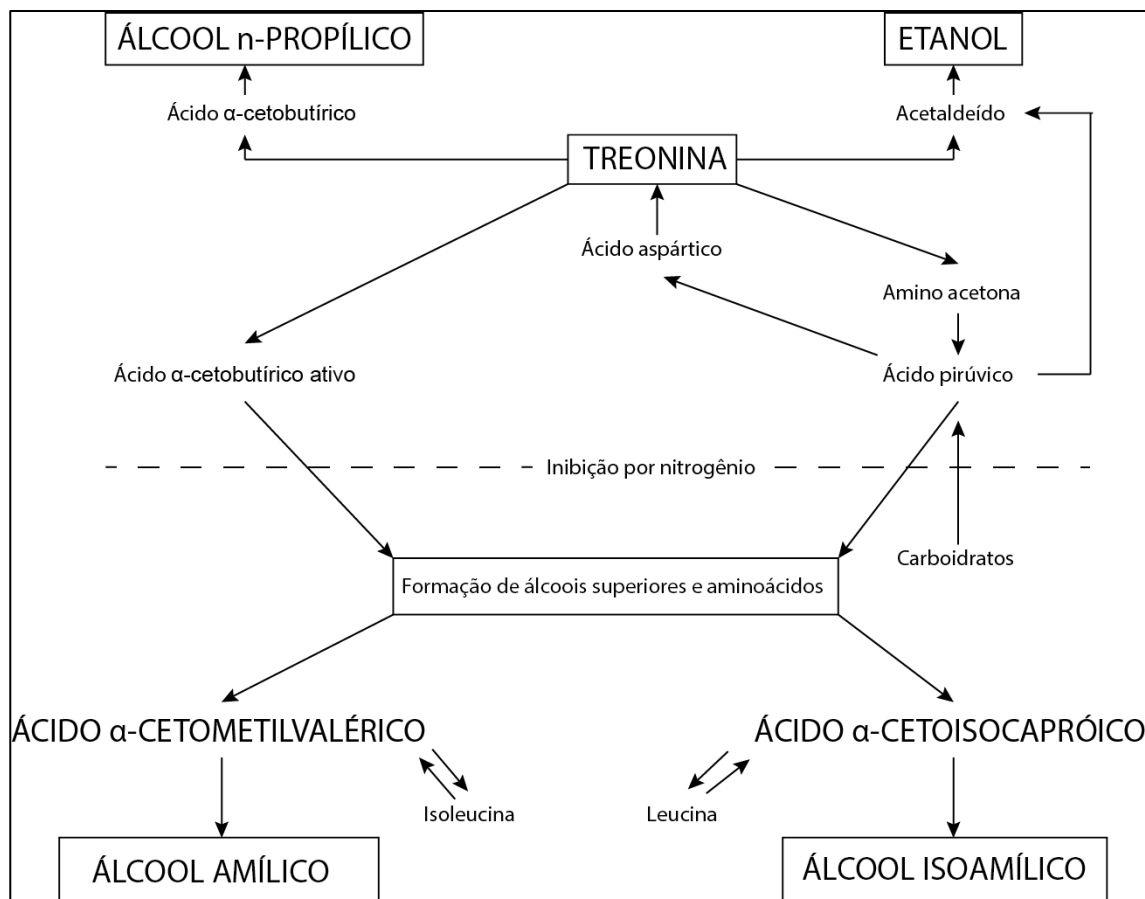
A maior parte das substâncias de aroma compreendem uma classe chamada de álcoois superiores, como observado na Tabela 6. Sua concentração varia de acordo com cada bebida, em bebidas como o rum uma média de  $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ , uísques uma média de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  e em conhaques até  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  (Abbas, 2006). A maioria dos álcoois superiores produzidos por leveduras são o álcool isoamílico, álcool n-propílico, álcool isobutílico, entre outros.

**Tabela 6 – Principais compostos de aroma em bebidas alcoólicas. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.**

<b>Composto</b>	<b>Número de compostos</b>
Álcoois	38
Ácidos	80
Ésteres	118
Compostos carbonílicos	41
Acetais	17
Fenóis	41
Hidrocarbonetos	11
Compostos nitrogenados	18
Compostos sulfúricos	11
Lactonas	17
Açúcares	4
Compostos não classificados	11
<b>Total</b>	<b>407</b>

Existem diversas teorias de como os álcoois superiores são produzidos pelas leveduras, porém a mais aceita é que eles são produtos da derivação catabólica de aminoácidos exógenos como leucina, isoleucina, valina e treonina. *S. cerevisiae*, por exemplo, apresenta formação de álcool amílico ao crescer em meio contendo leucina, e formação de álcool n-propílico e álcool isoamílico quando em presença de treonina (Abbas, 2006, p. 285).

Alguns álcoois e seus aminoácidos precursores estão apresentados na Figura 8.



**Figura 8 - Relação catabólica entre aminoácidos como leucina, isoleucina e treonina na produção de álcoois superiores. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.**

#### 2.4.2. Ácidos Graxos

Um importante grupo de substâncias de aroma em bebidas alcoólicas são os ácidos graxos de cadeia pequena como o ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, caprílico, octanóico e hexanóico e o ácido cáprico. Apesar de produzido de forma independente da matéria-prima utilizada, o conteúdo de ácidos graxos em bebidas varia muito. Ainda não é conhecida como é influenciada a produção desses compostos, porém observa-se que a levedura utilizada, a composição do meio, a temperatura e a aeração influenciam no conteúdo final de ácidos graxos, o tamanho de suas cadeias e seu nível de saturação. À 10 °C, por exemplo, cepas de *S. cerevisiae* excretam maior conteúdo de ácidos caprílico e caprílico do que observado à 30 °C (Abbas, 2006, p. 285).

Os ácidos graxos com cadeia de 6 à 10 carbonos, presentes na cerveja, por exemplo, contribuem para o que chama-se de “gosto caprílico”, caracterizado por gosto de ranço ou sabão (Bravi *et al.*, 2017).

### 2.4.3. Ésteres

O conteúdo de ésteres presentes em bebidas alcoólicas é refletido na percepção de seus aromas. Derivados de ácidos graxos, são classificados de acordo com seu ponto de ebulição, como leve, médio e pesado. A fração leve consiste de ésteres frutados de aromas agradáveis que incluem todos os ésteres com ponto de ebulição menor que o álcool isoamílico. A fração média compreende os ésteres etílicos que ebulam entre o etil caproato e o álcool fenilético. Compreendem ésteres derivados do ácido caprílico e do ácido cáprico. Enquanto os de classificação médio, são todos que ebulam acima do fenilético (Abbas, 2006, p. 285).

A produção de ésteres é similar à produção de ácidos graxos, sendo representada na Figura 9 e 10.

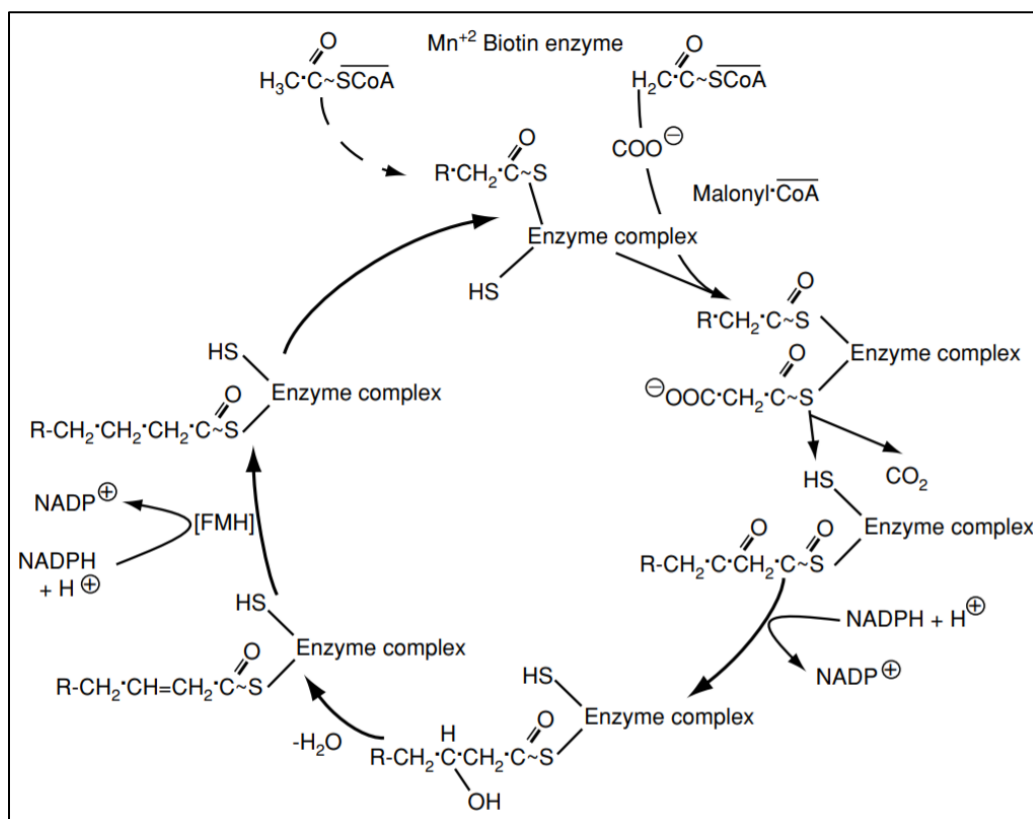
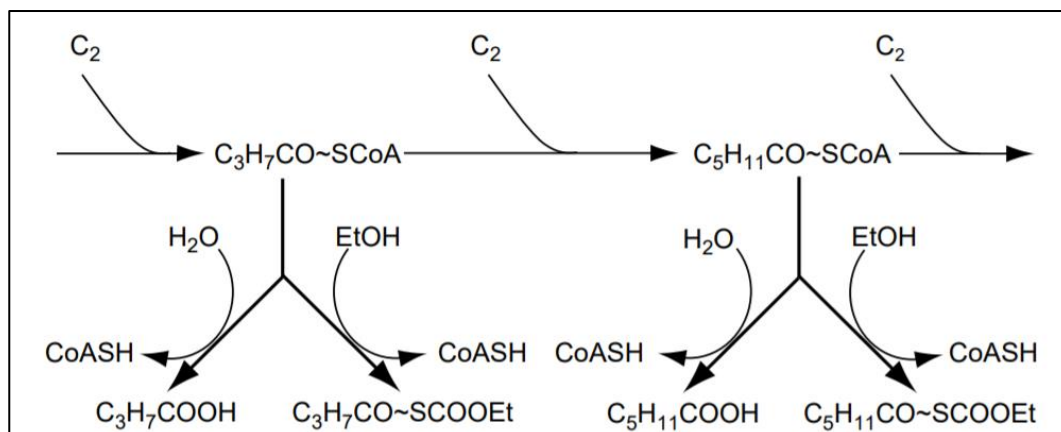


Figura 9 - Esquema da produção de ácidos graxos pelas leveduras. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.



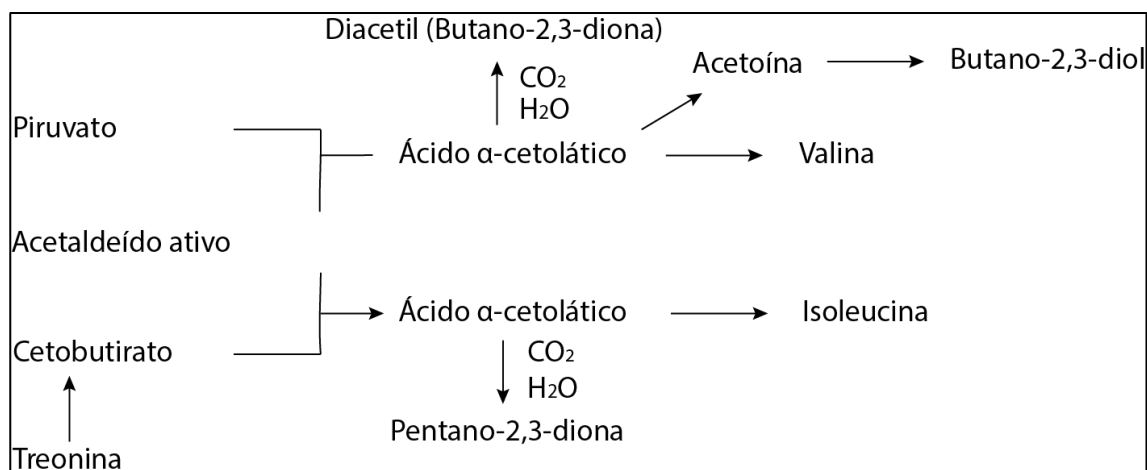
**Figura 10 – Esquema da produção de ésteres de ácidos graxos pelas leveduras.**  
**Fonte: Abbas, 2006, p. 285.**

A produção de ésteres voláteis pelas leveduras durante a fermentação depende muito do tipo de fonte de carbono e do tipo de nitrogênio assimilável do meio, além de oxigênio dissolvido e a quantidade de inóculo utilizada (Abbas, 2006, p. 285).

#### **2.4.4. Compostos Fenólicos, Carbonílicos e Sulfúricos**

Compostos fenólicos, carbonílicos e sulfúricos são de grande interesse na fermentação de bebidas pois contribuem para diversos odores indesejados, chamados de “*off-flavors*”. Os compostos carbonílicos de interesse são geralmente aldeídos intermediários da produção de álcoois superiores, como o diacetil, composto responsável pelo gosto de amanteigado em cervejas. Ele é formado durante as fermentações pela descarboxilação do ácido  $\alpha$ -acetolático (Abbas, 2006, p. 285), e seu processo de formação está esquematizado na Figura 11.

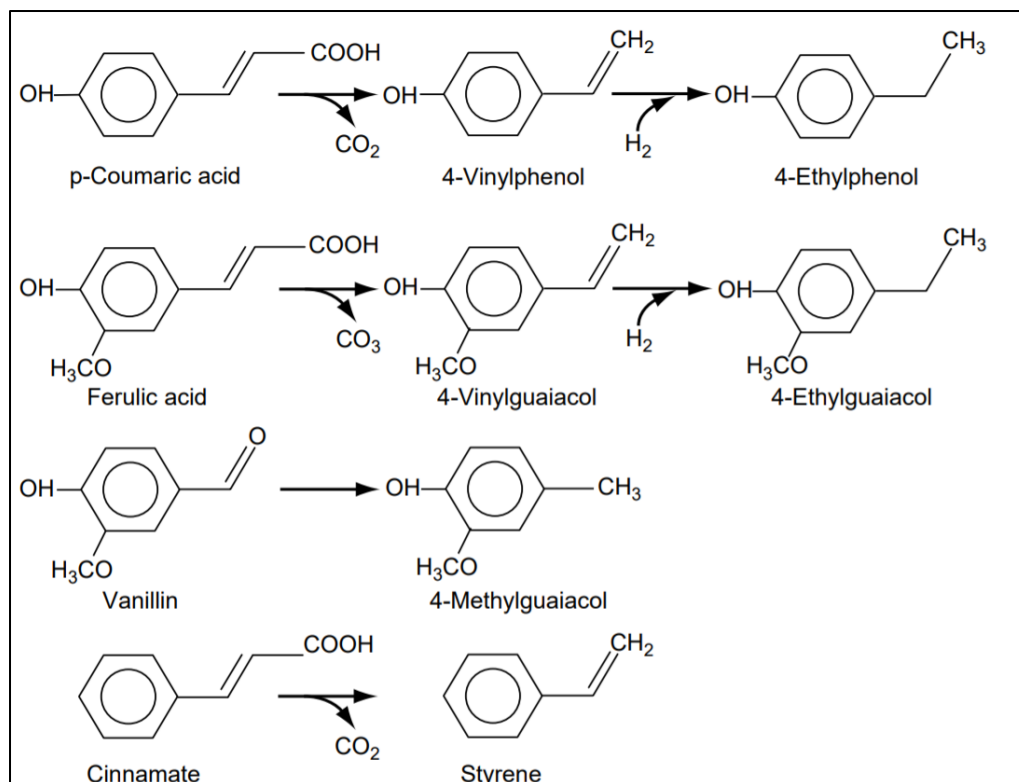




**Figura 11 – Descarboxilação e formação de diacetil e pentano-2,3-diona.**  
Adaptado de Abbas, 2006, p. 285.

Compostos sulfurosos são geralmente derivados da degradação os aminoácidos cisteína e metionina, como dietil sulfito, dimetil sulfito e o odor característico de sulfeto de hidrogênio. Entretanto, sulfitos podem ter um efeito positivo em bebidas alcoólicas quando são produzidos durante as fermentações pelas leveduras, agindo como antioxidantes e estabilizadores de aroma (Abbas, 2006, p. 285).

Compostos fenólicos, por sua vez, são derivados dos ácidos ferúlicos e vanilina, principalmente formados por 4-etilfenol, 4-etil guaiacol e 4-metil guaiacol, como apresentados na Figura 12.



**Figura 12 – Compostos fenólicos produzidos pelas leveduras durante a fermentação e seus precursores. Fonte: Abbas, 2006, p. 285.**

Esses compostos, geralmente em concentrações acima de 100 ppb apresentam o odor característico fenólico, principalmente em cervejas e vinhos. São produzidos pelas leveduras *S. cerevisiae*, porém também produzidos por leveduras dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* (Abbas, 2006).

#### 2.4.5. Outros compostos

Há diversos outros compostos que contribuem para o aroma e são metabólitos secundários de leveduras. Dentre eles, subprodutos da quebra de açúcares como furanonas, fufural e hidroximetilfurfural (HMF), e seus respectivos álcoois, cetonas, ácidos orgânicos como o ácido acético, cetonas proquirais e álcoois quirais (Abbas, 2006, p. 285).

#### 2.5. Estresse Fermentativo

É chamado de estresse toda situação do ambiente que ameace a sobrevivência da célula, sendo ela de um organismo unicelular ou multicelular. As células das leveduras, por exemplo, demandam uma complexa rede para sentirem as mudanças no ambiente e reagirem às mesmas. Dessa maneira, pode-se dizer que o estresse fermentativo são todas as condições fermentativas,

que ameaçam a sobrevivência das células, necessitando de uma resposta rápida ao estresse (Hohmann & Mager, 2003).

Microrganismos vivendo naturalmente, como leveduras, encontram diversas condições ambientais. Sem mecanismos rápidos de ação às mudanças no ambiente, as células não conseguiriam se proliferar e morreriam. As mudanças ambientais podem ser de origem física, como temperatura, pressão, radiação ou químicas, como a presença de íons, sais, pH, agentes químicos e até a presença de água. Na natureza, existem mais condições em plena mudança do que em condições constantes como encontra-se em laboratórios. Devido a esse contexto, o conhecimento das respostas aos estresses é fundamental para compreender o estresse fermentativo em si (Hohmann & Mager, 2003).

#### **2.5.1. Resposta às mudanças de temperatura**

O aumento de temperatura do ambiente, também chamado de estresse térmico, se refere à situações em que o microrganismo precisa se adaptar às mudanças de temperatura, produzindo proteínas resistentes à altas temperaturas, que desempenham papel protetivo nas proteínas comuns. Além disso, as células tendem a acumular trealoses em situações de estresse térmico. Esse dissacarídeo é usado como reserva energética e citoprotetor, impedindo que as proteínas se agreguem e se dobrem umas nas outras, consequência essa da desnaturação. Além do estresse térmico, observa-se que as células em fase estacionária possuem maior quantidade acumulada de trealose do que as células em fase exponencial de crescimento (Hohmann & Mager, 2003).

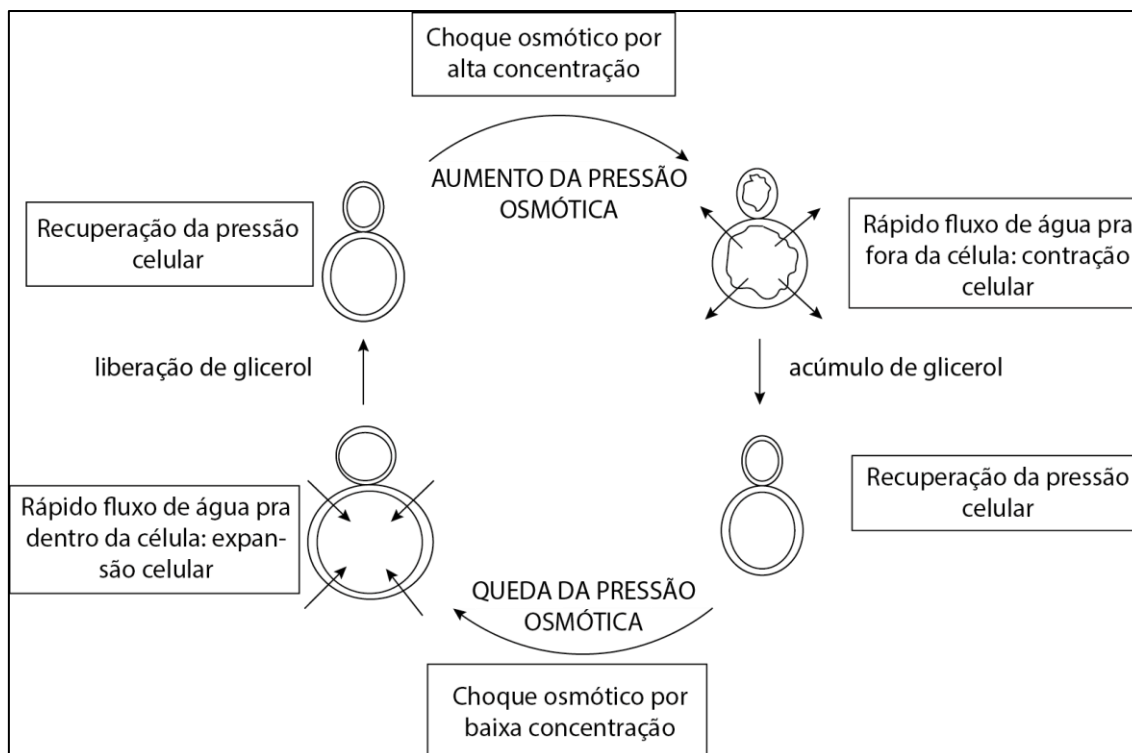
#### **2.5.2. Resposta à mudanças na pressão osmótica**

Naturalmente, as leveduras na natureza se submetem à diversas mudanças no que se refere à presença de água e conseqüentemente, sua osmolaridade. Por exemplo, as leveduras que vivem na casca de frutas estão em contato total com o aumento da concentração de açúcares do fruto, bem como rapidamente esse valor pode abaixar devido a chuva, por exemplo. Dessa forma, sentir e responder rapidamente à essas variações é de crucial importância para a sobrevivência (Hohmann & Mager, 2003).

Estresse osmótico é caracterizado pelo subto aumento ou decréscimo da presença de determinado soluto, este que altera a disponibilidade de água pela célula. Se nas redondezas do microrganismo houver alta concentração de solutos, haverá naturalmente um fluxo de água de dentro para fora das células, que se não controlado pode ser fatal. O inverso também ocorre quando a pressão osmótica é no sentido em que a água é quem entra dentro da célula. Para conter esses agravantes, as células produzem e acumulam substâncias chamadas de osmoprotetores, que nada mais são do que compostos que impedem o fluxo de água de sair das células. Quando o meio se torna menos concentrado, a célula expelle esses compostos.

As consequências do choque osmótico para as células é de nível estrutural. Há perturbações na membrana plasmática, alterando sua permeabilidade e suas propriedades mecânicas. O metabolismo relacionado à produção de lipídeos é extremamente afetado, alterando a produção de fosfolipídios e o ergosterol, componente importante na parede celular (Hohmann & Mager, 2003).

Na Figura 13 está apresentado o esquema de osmoregulação das leveduras através do acúmulo de glicerol.



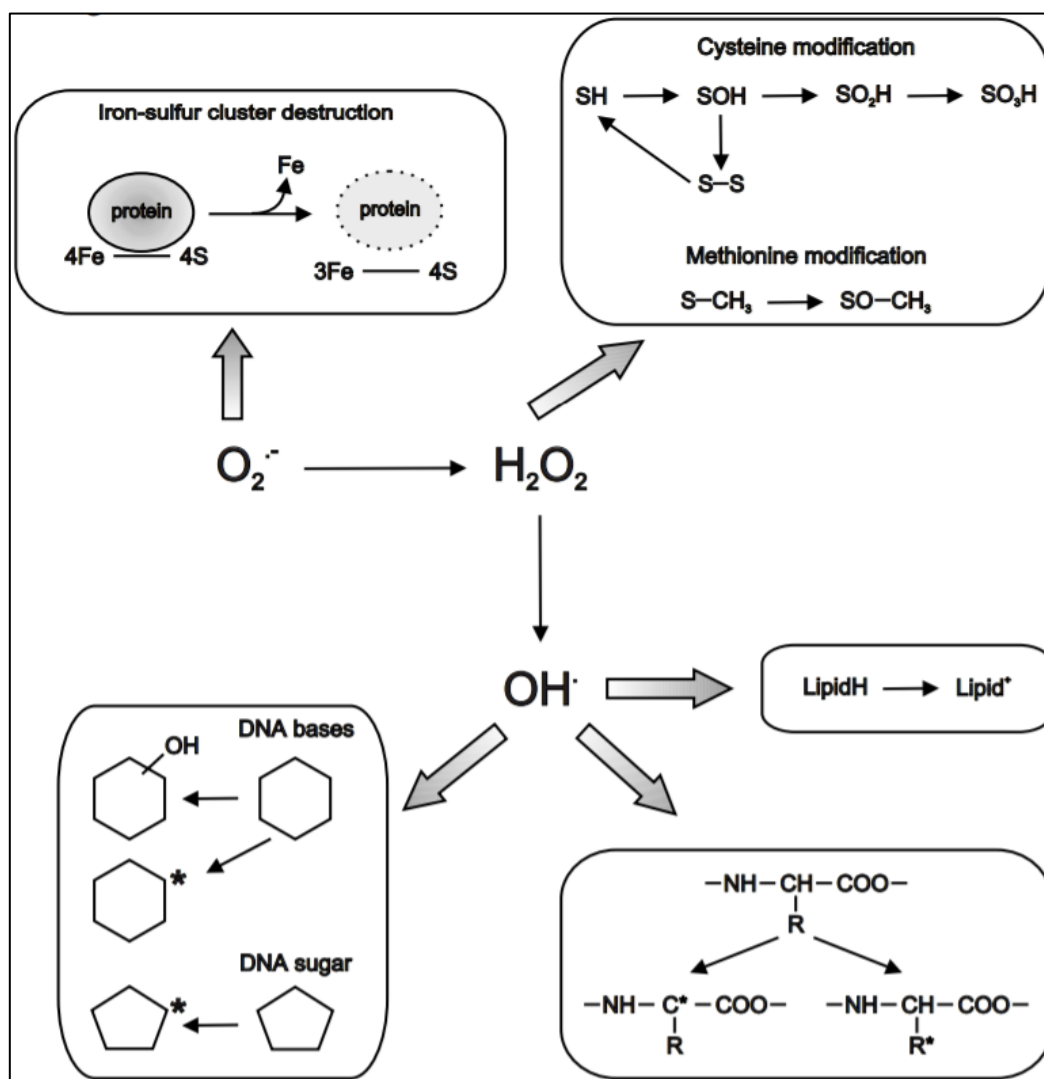
**Figura 13 – Mecanismo de osmoproteção de glicerol das leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

O glicerol é um álcool que também pode ser utilizado pelas leveduras como fonte de carbono e energia. Além disso, ele também pode ser produzido como subproduto durante um processo fermentativo de açúcares em etanol, e desempenha diversas e importantes funções fisiológicas. É formado por via glicolítica a partir da dihidroxiacetona fosfato em duas etapas: primeiro é este é reduzido à glicerol-3-fosfato catalisado pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gpd). Glicerol-3-fosfato é então desfosforilada pela glicerol-3-fosfato fosfatase (Gpp) para então, glicerol.

### 2.5.3. Resposta ao estresse oxidativo

Entende-se por estresse oxidativo, o estresse que as leveduras sofrem pela alta concentração de oxigênio, que por seu grande poder oxidante, gera compostos oxidantes dentro das células. As leveduras, por sua vez, possuem sistemas de neutralização, principalmente à base de ferro e cobre, que impedem os danos dessas dessas espécies no metabolismo celular (Hohmann & Mager, 2003).

Os principais compostos oxidantes são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Essas espécies atacam diversas moléculas e sistemas intracelulares (Hohmann & Mager, 2003). Na Figura 14 está esquematizado o processo de oxidação desses compostos.



**Figura 14 – Alterações moleculares causadas pelas espécies oxidativas derivadas do oxigênio. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

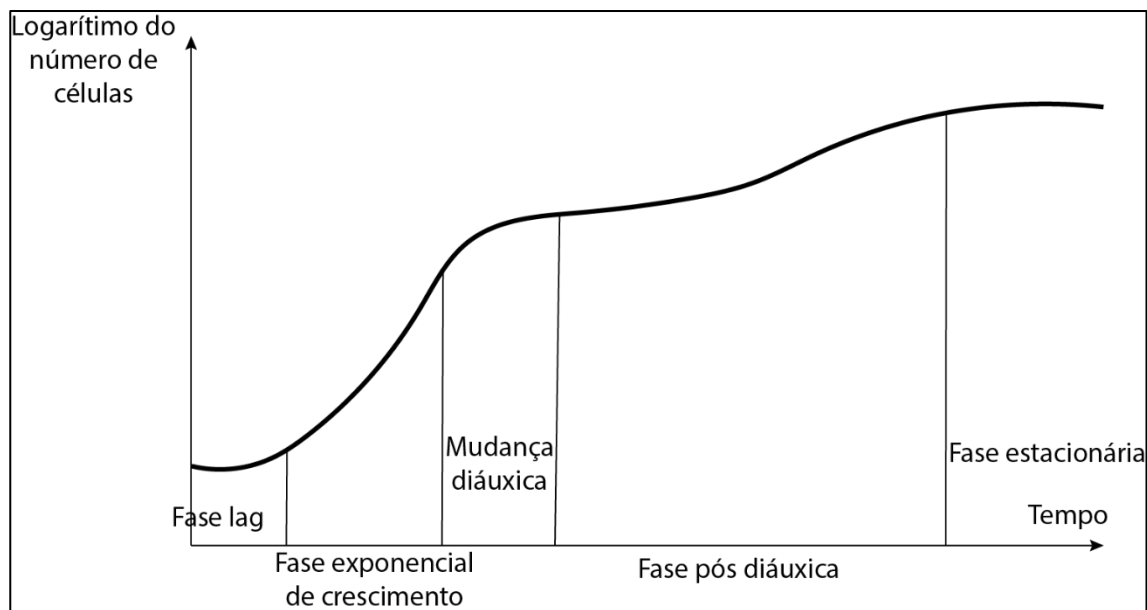
Das espécies em questão, o radical hidroxila se mostra o mais reativo. Ele retira prótons de moléculas criando novos radicais, que em cadeia atacam outras espécies. Em proteínas, causa a desnaturação devido à agregação e a cisão de sua estrutura. Em aminoácidos, causa a hidroxilação da tirosina, arginina, criando a ditirosina pela união dos radicais, reações irreversíveis que impedem a síntese proteica.

Os primeiros impactos a nível populacional desses radicais é a inibição do crescimento microbiano. Entretanto, observa-se que a resistência ao estresse oxidativo está intimamente ligado a capacidade respirativa das células, demonstrando que em situações em que as leveduras foram forçadas a respirar ao invés de fermentar, obtiveram maior tolerância aos radicais oxidantes (Hohmann & Mager, 2003).

#### **2.5.4. Adaptação à limitação de nutrientes**

As leveduras, vivendo na natureza, presenciam situações de abundância nutricional, bem como situações de escassez. Para manter a sobrevivência, geneticamente adaptaram-se a perceberem as situações ambientais ao seu redor e saber a hora certa de mudar seu metabolismo. Quando determinado nutriente essencial tem sua concentração reduzida ou até encontra-se disponível, as células encerram a proliferação e entram em um estado de sobrevivência, chamado de fase estacionária.

Para que as células entrem do estado de riqueza nutricional para o estado de pobreza nutricional, ocorre uma mudança no metabolismo chamada de “mudança diauxíca”, em que determinadas substâncias são substituídas por outras para suprir as necessidades. Por exemplo, em determinadas situações as leveduras sob escassez de açúcares utilizam etanol e glicerol, expelidas por elas mesmas, como fonte energética e de carbono, necessitando de uma mudança metabólica para processar esses compostos (Hohmann & Mager, 2003).



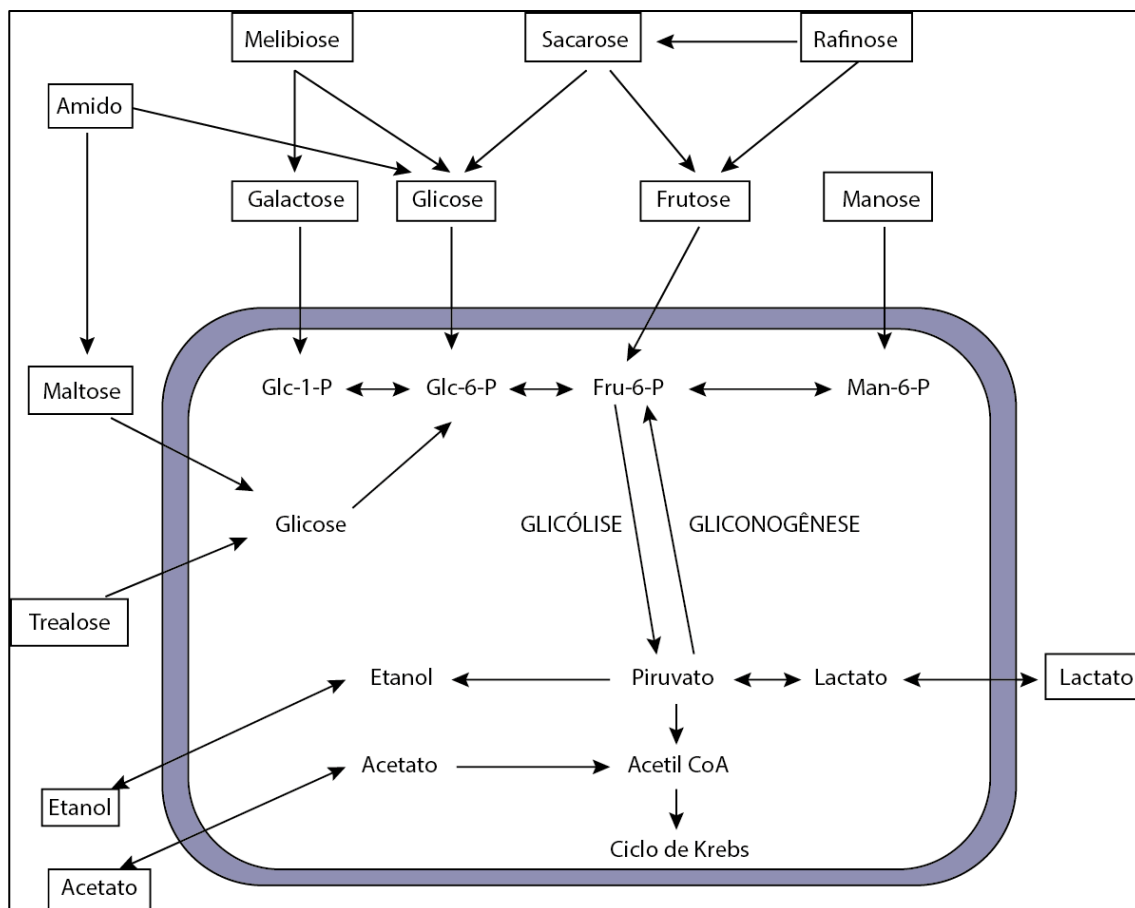
**Figura 15 – Típica mudança diáuxica em uma fermentação em que a fonte de carbono (açúcares) é limitante. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

Na Figura 15 está apresentada uma curva típica de crescimento microbiano em que há fonte de carbono como nutriente limitante. Até o fim da fase exponencial há crescimento exponencial de microrganismos, encerrando-se com a limitação da fonte de carbono. Após a mudança diáuxica o metabolismo é reprogramado para utilizar outras fontes de carbono disponíveis no meio, apresentando outra fase de crescimento posteriormente. Ao fim, com a total falta de fontes de carbono no meio, inicia-se a fase estacionária (Hohmann & Mager, 2003).

#### **2.5.4.1. Limitação de fontes de carbono**

Leveduras utilizam açúcares em forma de hexoses como fonte de carbono e energia, com uma relação média em condições anaeróbias de 70% transformadas em etanol e gás carbônico, 20% transformada em biomassa, 8% para a produção de glicerol e 2% transformada em gás carbônico e água por via fosforilase oxidativa dentro da mitocôndria (Hohmann & Mager, 2003).





**Figura 16 – Fluxo de carbono nas células de leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

Através da Figura 16 observa-se que as leveduras utilizam diversas fontes de carbono, que são metabolizadas muito das vezes por vias diferentes. Esses microrganismos, anaeróbios facultativos, preferem fermentar do que respirar, e isso pode parecer não ter sentido em vista da maior quantidade de ATP formado por molécula de glicose em vias com oxigênio. Porém, o crescimento anaeróbio produz etanol, glicerol e acetato, que pode ser utilizado após a mudança diáuxica como fonte de carbono, prolongando o crescimento e a sobrevivência. Além disso, observa-se metabolicamente uma preferência das leveduras pela glicose como fonte principal de carbono. Mesmo um crescimento na presença de diversos outros açúcares, a glicose é metabolizada primeiro. Há evidências de que a glicose induz a biossíntese e a ativação de enzimas que regulam o metabolismo ótimo da levedura para um crescimento rápido (Hohmann & Mager, 2003).

### 2.5.4.2. Limitação de fontes de nitrogênio

As espécies de *S. cerevisiae* utilizam diversas fontes de nitrogênio. Assim como a glicose é a fonte de carbono preferencial das leveduras, há também fontes preferenciais de nitrogênio, com efeitos similares de expressão genética. Fontes nitrogenadas como a amônia, glutamina ou aspargina causam repressão em enzimas que auxiliam na metabolização de outras fontes como a prolina e  $\gamma$ -aminobutirato (Hohmann & Mager, 2003). A preferência dos primeiros compostos citados está relacionada a sua forma de utilização, contida na Tabela 7.

**Tabela 7 – Intermediários para a utilização de fontes nitrogenadas pelas leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

$\text{NH}_3 + \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADPH}/\text{H}^+$	→	glutamato + $\text{NADP}^+$
$\text{NH}_3 + \text{glutamato} + \text{ATP}$	→	glutamina + $\text{ADP}/\text{P}^i$
glutamina + $\alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADH}/\text{H}^+$	→	2-glutamato + $\text{NAD}^+$
glutamato + $\text{NAD}^+$	→	$\alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NH}_3 + \text{NADH}/\text{H}^+$

As reações observadas na Tabela 7, principalmente as catalisadas pela glutamina sintase são essenciais para o crescimento microbiano, pois é necessária para a síntese de nucleotídeos e vários aminoácidos.

Analogamente às limitações de concentração de carbono, as leveduras podem apresentar situações similares às observadas na Figura 17, em que a mudança diáuxica é da troca das fontes preferenciais para outras como já citadas anteriormente. Observa-se também, que os mesmos mecanismos de repressão estão envolvidos nas limitações de nitrogênio e de carbono, entretanto não há um subproduto que possa ser utilizado como nova fonte de nitrogênio, apresentando um curto período entre a mudança diáuxica e a fase estacionária (Hohmann & Mager, 2003).

### 2.5.4.3. Limitação de fontes de fósforo

As fontes preferenciais de fósforo para as leveduras são as fontes inorgânicas, chamado de  $\text{P}_i$ . Entretanto, em condições limite de fósforo inorgânico as células passam a utilizar fontes orgânicas, através da ação de

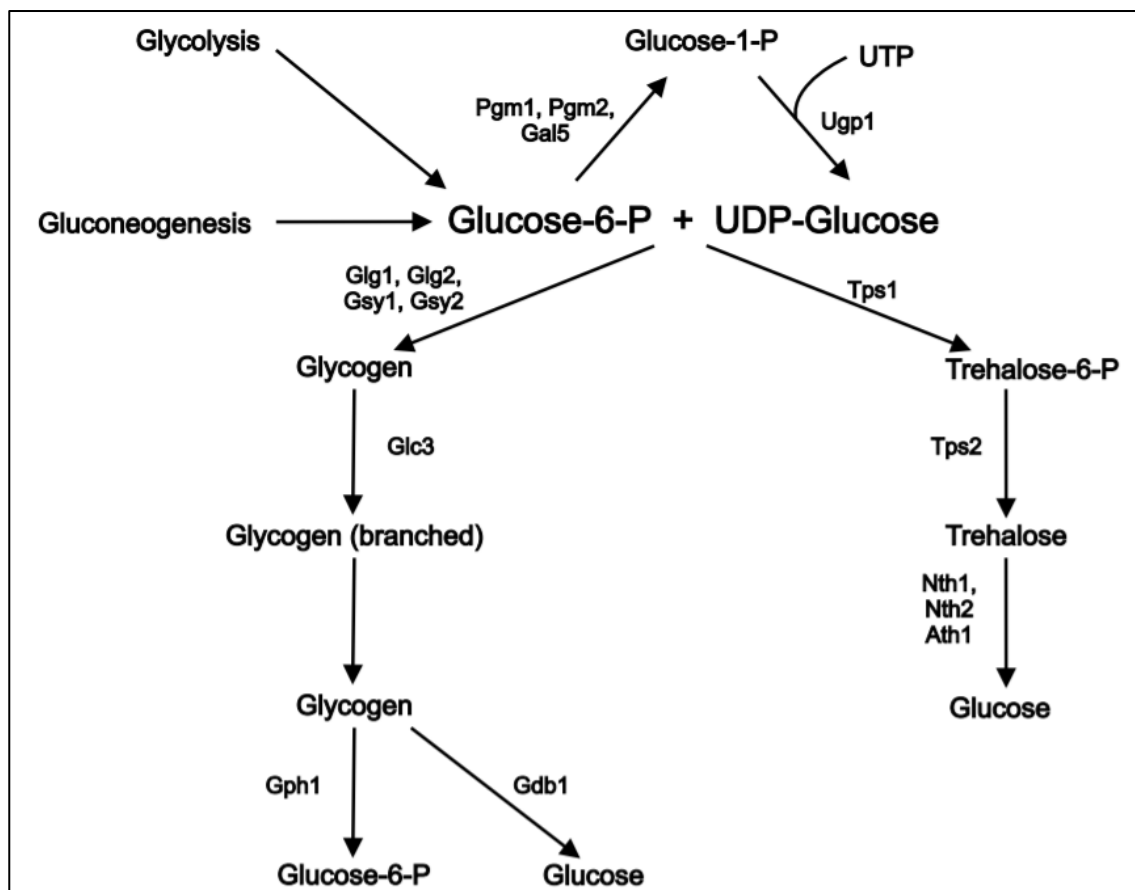
diversas fosfatases ácidas. Dessa maneira, um sistema de repressão é ativado para que ocorra uma mudança diáuxica para a utilização das fontes orgânicas. Acredita-se que a deficiência em fósforo cause problemas na síntese de glicogênio, principal reserva energética das leveduras (Hohmann & Mager, 2003).

#### **2.5.4.4. Limitação de fontes de enxofre**

O enxofre é um nutriente encontrado em pequenas quantidades nas células de leveduras, pois é utilizado restritivamente na síntese da metionina e da cisteína. O sulfato é a principal fonte de enxofre de leveduras do gênero *Saccharomyces*, em que é reduzido à sulfito para a biosíntese dos dois aminoácidos citados anteriormente. Quando metionina e cisteína estão em abundância na célula, automaticamente há uma inibição na assimilação de enxofre, ou seja, as limitações de enxofre só terão impactos significativos se esses aminoácidos estiverem em baixas concentrações (Hohmann & Mager, 2003).

#### **2.5.4.5. Respostas comuns à falta de nutrientes**

Quando as leveduras crescem exponencialmente em um meio com glicose como fonte principal de carbono e os nutrientes do meio começam a ficar escassos, as respostas à falta de nitrogênio, enxofre e fósforo são as mesmas. Trealose e glicogênio começam a ser acumulados nas células e as características de uma fase estacionária começam a surgir. Além disso, a suplementação em fases estacionárias apresenta a produção de trealases, indicando uma rápida resposta em relação ao consumo de reservas energéticas quando há nutriente novamente disponível no meio. Durante o crescimento microbiano há acúmulo de glicogênio antes do consumo total de açúcares do meio, enquanto que a trealose é formada apenas na mudança diáuxica. Na fase estacionária, por sua vez, há o consumo lento de trealose, que completamente se esvai junto da perda de viabilidade celular (Hohmann & Mager, 2003).



**Figura 17 – Mecanismos de reserva energética das leveduras. Fonte: Hohman & Mager, 2003.**

Através da Figura 17 observa-se o mecanismo de acúmulo de trealose e glicogênio nas células de leveduras, bem como sua posterior degradação em glicose novamente. Esse mecanismo demonstra que as expressões genéticas de inibição estão conectadas, mesmo que haja abundância de um nutriente e ausência de outro.

Morfologicamente, há impactos nas células de leveduras em condições de falta de nutrientes. Já foi observado que em condições de baixo conteúdo de nitrogênio as células obtiveram estruturas classificadas como pseudo hifas, sob a presença de oxigênio. Situações morfológicamente similares também foram observadas onde há excesso de compostos nitrogenados e baixas concentrações de fontes de carbono (Hohmann & Mager, 2003).

### **3. Motivação e Objetivos**

Essa dissertação teve como motivação o estudo da nutrição em processos fermentativos, compreendendo como é o comportamento do fermento comercial Itaiquara® em situações com nutrição fracionada e batelada alimentada para a produção de hidromel. Muitos autores relacionaram a presença de nitrogênio na cinética de fermentação com a produção de substâncias de aroma em vinhos. Outros, utilizaram diversas fontes de nutriente como objeto de estudo em hidroméis. Da mesma forma, o hidromel apresenta grande concentração de substâncias inibidoras, bem como alta concentração de açúcares.

Dessa maneira, o objetivo dessa dissertação foi estudar a cinética de fermentação do mosto de mel de abelhas, em condições similares às proporcionadas por produtores de hidromel, utilizando o fermento de panificação comercial Itaiquara® e um nutriente sintético, à base de extrato de levedo e fosfato diamônico (DAP), realizando ensaios fermentativos variando-se a adição de nutrientes e de mel durante o processo.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Mel de Abelhas

O mel de abelhas utilizado nos procedimentos foi obtido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM), pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), de florada silvestre e de abelhas do gênero *Apis*. Foram coletados aproximadamente 30 kg e armazenados em bombona para utilização nos experimentos (Figura 18).

A caracterização foi realizada segundo a metodologia descrita por *Association of Official Analytical Chemists* para cor, acidez, resíduo mineral fixo e umidade (AOAC, 1998). A composição de glicose e frutose foi obtida pela metodologia decrita adiante para os ensaios fermentativos por HPLC.



**Figura 18 – Obtenção do mel na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI/UEM).  
Fonte: O autor.**

### 4.2. Levedura

A levedura utilizada foi o fermento fresco de panificação Itaiquara®. Segundo informações do próprio fabricante, 1 g do fermento úmido possui em torno de 25 bilhões de células de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Para cada ensaio fermentativo foi utilizado um novo pacote de 500g fresco (Figura 19).



**Figura 19 – Fermento comercial de panificação Itaiquara® utilizado na pesquisa.  
Fonte: O autor.**

#### **4.3. Nutrientes**

O nutriente utilizado foi uma mistura de extrato de levedo hidrolisado (levedo de cerveja) comercial da Nutryervas®, comercializado como suplemento vitamínico, com fosfato de amônio dibásico Reagen® na proporção 70:30 em massa. Na Tabela 8 estão apresentadas as informações de composição do suplemento, fornecidas pelo fabricante.

**Tabela 8 – Informações da composição do levedo de cerveja hidrolisado da Nutryervas®.**

<b>Nome</b>	<b>Quantidade/100g</b>
Proteínas	45,0 g
Gorduras	0,9 g
Fibras	28 g
Ácido fólico	0,16 mg
Ácido pantotênico	2,20 mg
Vitamina A	< 20,0 UI
Vitamina B1	3,3 mg
Vitamina B2	3,3 mg
Vitamina B12	4,5 µg
Vitamina E	< 2,0 mg
Biotina	0,03 mg
Niacina	11,0 mg
Cálcio	209 mg
Cobre	3,71 mg
Ferro	14,6 mg
Fósforo	0,25 g
Magnésio	237 mg
Manganês	0,39
Potássio	1,87 g
Selênio	0,15 mg
Sódio	17,7 mg
Zinco	4,9 mg

O extrato de levedo, em péletes, foi macerado para tornar-se um pó de fácil dissolução, sendo novamente macerado junto ao fosfato de amônio, formando uma mistura homogênea em pó (Figura 20).





**Figura 20 – Maceração e mistura do nutriente. Fonte: O autor.**

#### **4.4. Ensaio Fermentativos**

Os ensaios fermentativos foram realizados em condições de batelada e batelada alimentada de substrato, com adição única de nutrientes e adição fracionada de nutrientes. Testou-se assim, concentrações diferentes de mel, adicionadas apenas no início da fermentação e adicionadas no início e passado determinado tempo. Também foram avaliados os efeitos da adição de nutrientes no início da fermentação (tempo zero) e seu fracionamento durante o processo fermentativo. Os nutrientes foram adicionados segundo recomendação de nutrientes comerciais, ou seja, na faixa de 20 à 40 g.hL<sup>-1</sup>, fixando-se 35 g.hL<sup>-1</sup>. Para os ensaios em que a concentração de nutrientes foi fracionada, utilizou-se recomendação de fracionamento de Piatz (2014), ou seja, divisão de 5 partes com 2 partes no início, e as outras 3 partes adicionadas nos momentos de atenuação de 25%, 50% e 75%, respectivamente. Através dos ensaios batelada pode-se supor quais seriam os intervalos ideais para a adição dos nutrientes. Os ensaios realizados estão contidos na Tabela 9.

**Tabela 9 – Ensaio fermentativos e suas respectivas condições de concentração de substrato e concentração de nutrientes.**

<b>Ensaio</b>	<b>Condição</b>	<b>Concentração de glicose + frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração de nutrientes (g.hL<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	Batelada de substrato e adição única de nutrientes	150	35
<b>2</b>	Batelada de substrato e adição única de nutrientes	150	35
<b>3</b>	Batelada de substrato e adição única de nutrientes	200	35
<b>4</b>	Batelada de substrato e adição fracionada de nutrientes	150	14+7+7+7
<b>5</b>	Batelada de substrato e adição única de nutrientes	300	35
<b>6</b>	Batelada alimentada de substrato e adição fracionada de nutrientes	150+50	14+7+7+7
<b>7</b>	Batelada alimentada de substrato e adição única de nutrientes	150+50	35

Todos os ensaios foram realizados à temperatura fixa de 22 °C (segundo observações de Gomes *et al.* (2013)), concentração de fermento de 10 g.L<sup>-1</sup> em massa úmida e volume total de 5 L. O reator utilizado foi o BIOSTAT™ B para os experimentos de 2 a 7 (Figura 21), no ensaio 1 foi utilizado um reator tipo convencional. Os ensaios eram realizados através da mistura da água potável filtrada com a adição do mel, dos nutrientes e da levedura ressuspendida, sem tratamento térmico ou químico do mosto. Após a mistura de todos os componentes o tempo zero era aferido.



**Figura 21 – Ensaio conduzido pelo autor. Fonte: O autor.**

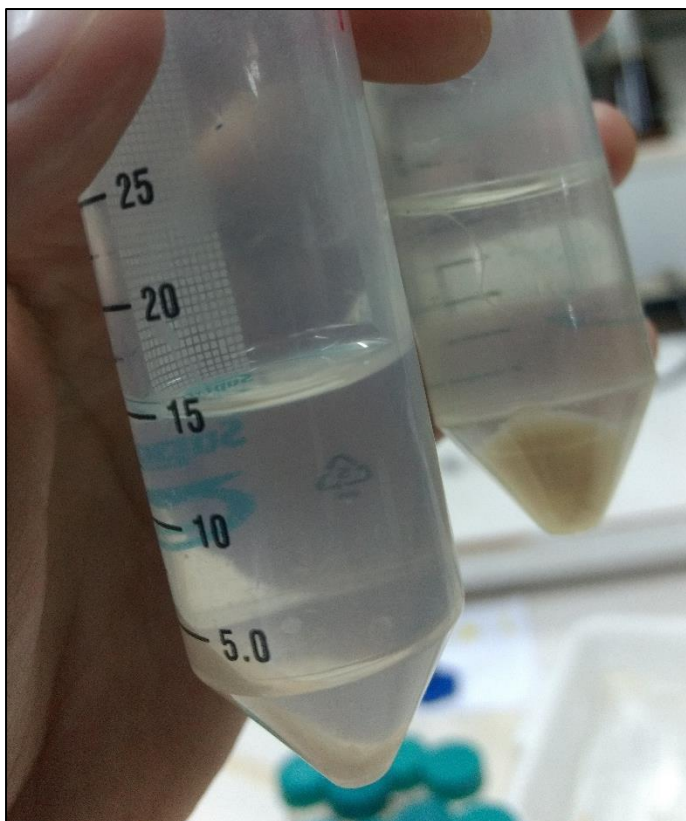
#### **4.4.1. Coleta e preparo de amostras**

Para realizar as análises necessárias, as amostras eram coletadas do fermentador pela seringa, por um duto situado no topo do fermentador, de tempos em tempos. Nas primeiras 24h optou-se por coletas de 4 em 4h e no restante do tempo de 6 em 6h e de 12 em 12h, até observar o final da fermentação através do fim da atividade (produção de bolhas). Coletou-se aproximadamente 30 mL, estas as quais foram colocadas em tubo Falcon para decantação forçada das leveduras e uso do sobrenadante para análises posteriores (Figura 22 e 23).



**Figura 22 – Retirada do sobrenadante das amostras coletas. Fonte: O autor.**

O sobrenadante era retirado e adicionado à frascos cilíndricos de acrílico para análise de pH. Após essa análise os frascos foram devidamente etiquetados e mantidos em freezer à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para as análises de glicose, frutose, glicerol, ácido acético e etanol, e voláteis. O material decantado (leveduras) foi lavado através de repetidas centrifugações com água destilada, até o sobrenadante tornar-se translúcido e a levedura apresentar coloração uniforme (Figura 23). Depois disso os frascos com leveduras eram etiquetados e armazenados em geladeira até o fim da coleta de amostras para que sua concentração fosse determinada.



**Figura 23 – Leveduras sendo lavadas por centrifugação com água destilada.**  
Fonte: O autor.

#### **4.5. Metodologias de análise**

##### **4.5.1. Quantificação de Glicose, Frutose, Glicerol, Ácido Acético e Etanol nas amostras**

Para compreender o comportamento da cinética de fermentação dos ensaios, foram determinadas as concentrações dos açúcares principais do mel de abelhas (glicose e frutose), glicerol (metabólito secundário de interesse), ácido acético (indicador de contaminação e de estresse da levedura) e etanol (produto principal de interesse) através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com coluna Aminex™ HPX-87H, detector RI à 50 °C, com vazão de 0,60 mL.min<sup>-1</sup>, usando água ultrapura acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM) como fase móvel. Foi realizada curva padrão para determinação da concentração das amostras, relacionando a área do pico observada no equipamento com a concentração padrão diluída.

#### 4.5.1.1. Curva padrão para Glicose

Para a obtenção das concentrações de glicose dos ensaios realizados utilizou-se a Equação 11, através da curva padrão de glicose apresentada na Figura 61 do Anexo A1.

$$C_{glicose}(mg.L^{-1}) = 191,09 * A_{pico} - 5,64 \quad (\text{Eq. 11})$$

#### 4.5.1.2. Curva padrão para Frutose

Para a obtenção das concentrações de frutose dos ensaios realizados utilizou-se a Equação 12, através da curva padrão de glicose apresentada na Figura 62 do Anexo A1.

$$C_{frutose}(mg.L^{-1}) = 215,16 * A_{pico} + 0,51 \quad (\text{Eq. 12})$$

#### 4.5.1.3. Curva padrão para Glicerol

Para a obtenção das concentrações de glicerol dos ensaios realizados utilizou-se a Equação 13, através da curva padrão de glicerol apresentada na Figura 63 do Anexo A1.

$$C_{glicerol}(mg.L^{-1}) = 278,40 * A_{pico} + 2,13 \quad (\text{Eq. 13})$$

#### 4.5.1.4. Curva padrão para Ácido acético

Para a obtenção das concentrações de ácido acético dos ensaios realizados utilizou-se a Equação 14, através da curva padrão de ácido acético apresentada na Figura 64 do Anexo A1.

$$C_{acético}(mg.L^{-1}) = 515,70 * A_{pico} + 0,53 \quad (\text{Eq. 14})$$

#### 4.5.1.5. Curva padrão para Etanol

Para a obtenção das concentrações de etanol dos ensaios realizados utilizou-se a Equação 15, através da curva padrão de etanol apresentada na Figura 65 do Anexo A1.

$$C_{etanol}(mg.L^{-1}) = 668,40 * A_{pico} - 21,66 \quad (\text{Eq. 15})$$

Utilizando-se das curvas de calibração realizadas, calculou-se os resultados de concentração dos compostos das amostras dos ensaios fermentativos. Na Figura 24 está apresentado um cromatograma típico analisado.

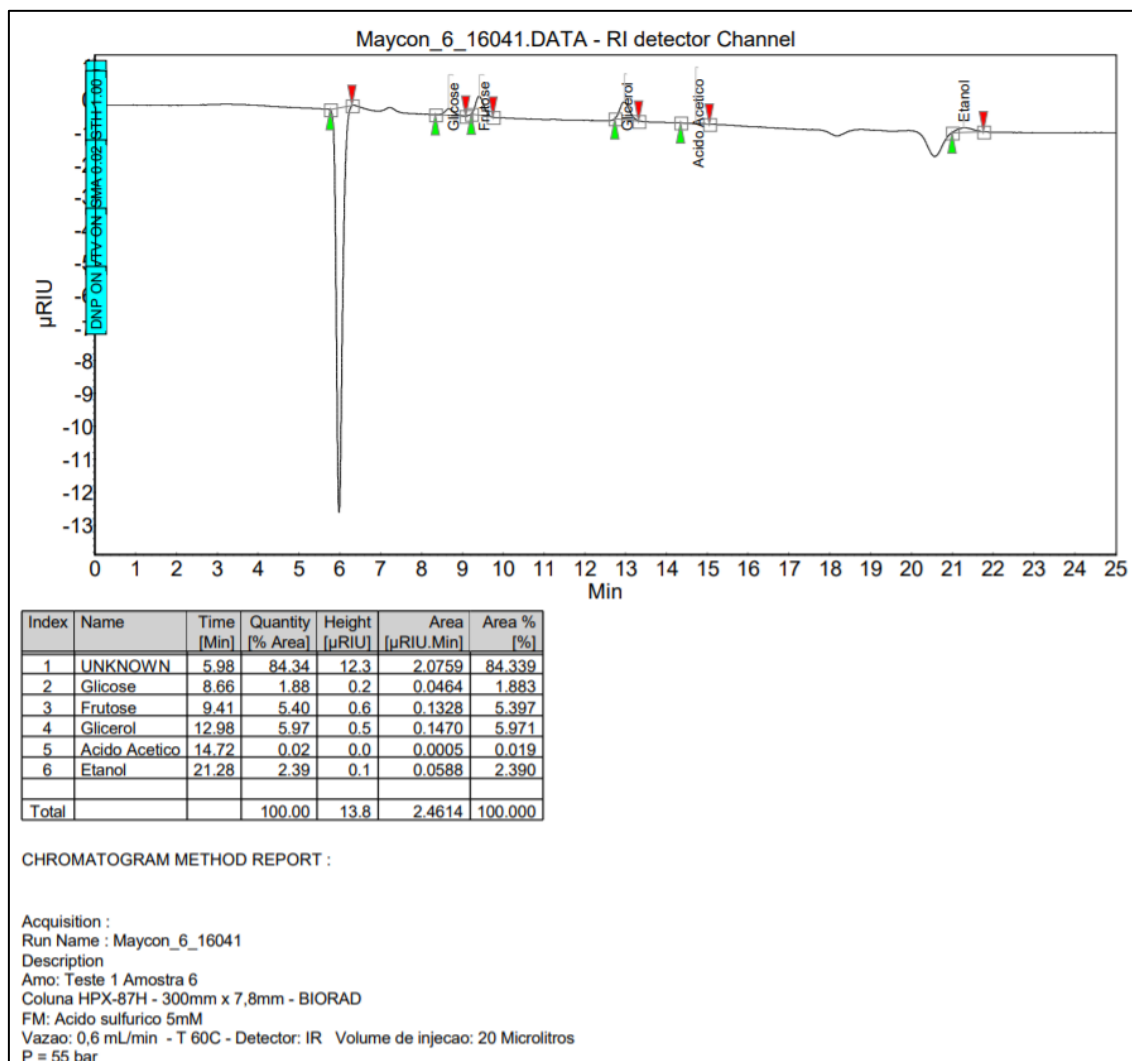


Figura 24 - Cromatograma típico das análises realizadas por HPLC. Fonte: O autor.

#### 4.5.2. Biomassa (massa úmida)

Para a estimativa da concentração de biomassa nas amostras coletadas, foi utilizado o método espectrofotométrico proposto por Olivo (1985), medindo-se a absorbância da amostra diluída à 600 nm, com água destilada como branco. Para o cálculo da concentração foi utilizada a Equação 16, baseada na curva padrão obtida da Figura 66 do Anexo A1.

$$C_{biomassa}(g \cdot L^{-1}) = 1,09 * Abs + 0,008 \quad (\text{Eq. 16})$$

#### 4.5.3. Análise de Nitrogênio Amino Livre (FAN)

Para a quantificação de nitrogênio amino livre (FAN), também conhecido como Nitrogênio Assimilável por leveduras (YAN), foi utilizada a metodologia descrita por Abernathy, Spedding & Starcher (2009), utilizando o reagente ninidrina (2%) em solução de etilenoglicol e acetato de sódio (pH 5,5), determinado por espectrofotometria à 575 nm com glicina como branco. As análises foram realizadas no Departamento de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

A curva padrão para o cálculo da concentração de nitrogênio amino livre está apresentado na Figura 67 do Anexo A1. Através da Figura 34 calculou-se a concentração pela Equação (17).

$$C_{FAN}(ppm) = 13,82 * Abs + 1,49 \quad (\text{Eq. 17})$$

#### 4.5.4. Quantificação de compostos voláteis nas amostras

Três compostos voláteis (metabólitos secundários) foram determinados e quantificados, álcool isoamílico, álcool 2-feniletil e álcool isobutílico. A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por OIV (2015), em cromatógrafo a gás (Shimadzu® GC-17A modelo QP5050) com detector de ionização de chama (FID), equipado com coluna capilar Supelco PAG de dimensões 30 mm x 0,25 mm de espessura do filme x 0,25 µm de diâmetro interno, da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Alimentos. O hélio foi usado como gás de arraste, o ar sintético como gás de ignição e manutenção da chama e o gás hidrogênio como fonte de combustível para a chama do



detector FID. Para comparação da área dos picos com a concentração dos componentes avaliados foi utilizada a técnica do padrão interno, onde a substância ausente na amostra injetada foi o 4-metil-2-pentanol ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), juntamente com os demais padrões a que foram avaliados: álcool isoamílico, álcool 2-feniletil, álcool isobutílico, acetato de etila, 1-propanol, acetato de isoamila, hexanoato de etila, 1-pentanol, octanoato de etila, acetato 2-feniletil e acetaldeído.

As curvas-padrão para os compostos voláteis detectados nas amostras (álcool isoamílico, álcool 2-feniletil e álcool isobutílico) estão apresentadas nas Figuras 68, 69 e 70. As equações para o cálculo das concentrações estão apresentados nas Equações (18), (19) e (20).

$$C_{\text{álcool isoamílico}}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 2,28 \cdot 10^{-6} * A_{\text{pico}} - 0,00311 \quad (\text{Eq. 18})$$

$$C_{\text{álcool 2-feniletil}}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 1,98 \cdot 10^{-6} * A_{\text{pico}} - 1,97 \cdot 10^{-4} \quad (\text{Eq. 19})$$

$$C_{\text{álcool isobutílico}}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 1,88 \cdot 10^{-6} * A_{\text{pico}} - 0,00138 \quad (\text{Eq. 20})$$

## 4.6. Análises dos resultados obtidos

### 4.6.1. Fase exponencial de crescimento

Para observar a fase exponencial de crescimento e obter o valor de velocidade específica de crescimento para essa fase, calculou-se o logaritmo natural da concentração de biomassa, plotou-se a mesma em função do tempo de modo a obter uma regressão similar às Equações (03) e (04). Utilizou-se o software OriginPro™ 8.5 para regressão linear dos dados.

### 4.6.2. Ajustes polinomiais para o consumo de glicose, frutose e produção de etanol

Plotou-se os dados experimentais de concentração para glicose, frutose e etanol dos ensaios realizados. Observou-se o comportamento global dos

dados e traçou-se ajustes polinomiais a fim de se obter um comportamento ajustado da variação das concentrações.

#### 4.6.3. Cálculo de rendimento e eficiência em etanol

Foi então definido como sendo o rendimento o valor de  $Y_{P/S}$ , como sendo a concentração de etanol produzida ao fim da fermentação dividido pelas concentrações de açúcares glicose e frutose do mosto inicial, mais a concentração adicionada tardiamente (caso ocorresse), subtraída da concentração residual de glicose e frutose, como na Equação (21).

$$Y_{\frac{P}{S}} \left( \frac{g/L \text{ etanol}}{\frac{g}{L} (glicose + frutose)} \right) \quad (\text{Eq. 21})$$

$$= \frac{C_{\text{etanol}}}{(C_{\text{glicose}} + C_{\text{frutose}})_i - (C_{\text{glicose}} + C_{\text{frutose}})_f}$$

A eficiência foi calculada como sendo o rendimento dividido pelo máximo valor possível estequiométrico de rendimento (0,511 g etanol/g substrato), expresso em porcentagem, como na Equação (22).

$$\varepsilon (\%) = 100 * \left( \frac{Y_{P/S}}{0,511} \right) \quad (\text{Eq. 22})$$

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Caracterização do Mel de Abelhas

A caracterização do mel de abelhas está apresentada na Tabela 10, assim como os parâmetros comparativos de qualidade do mel baseados na legislação vigente brasileira (Brasil, 2000).

**Tabela 10 – Qualidade do Mel utilizado utilizado nos ensaios fermentativos.**

Parâmetro	Análise	Legislação
<b>Cor (Escala Pfund)</b>	Âmbar	-
<b>Acidez (meq NaOH.kg<sup>-1</sup>)</b>	41	<50
<b>Resíduo mineral fixo (%)</b>	0,5378	<0,6
<b>Umidade (%)</b>	17,3	<20
<b>Glicose (%)</b>	31,9	>65
<b>Frutose (%)</b>	37,1	

O mel em questão apresentou os parâmetros dentro da legislação vigente, além de cor escura e acidez notável ao paladar. Observa-se que há elevada quantidade de minerais no mel o que contribui significativamente para sua cor âmbar (Gupta & Sharma, 2009). Além disso, o período de estocagem, em países como o Brasil em que a média anual de temperatura é superior à 20 °C, tendem a facilitar reações como caramelização e a reação de Maillard, e até a degradação dos açúcares pelas enzimas do mel (Moreira *et al.*, 2010).

Observou-se também cristalização do mel ao longo de todo o período de experimentação. No inverno de 2018 o mel cristalizou, apresentando liquefação nos meses mais quentes. Gupta & Sharma (2009) salientam que o mel é uma solução supersaturada de sólidos, e que devido à menor solubilidade da glicose em relação à frutose, a cristalização é um processo natural do mel. A ocorrência desses fenômenos, entretanto, prejudica a padronização da matéria-prima utilizada.

### 5.2. Resultados dos Ensaio Fermentativos

Os ensaios fermentativos apresentaram duração entre 80 e 120 horas, em que a maioria dos açúcares do mosto foi consumida. Por essa razão, os

redimentos e eficiências em etanol foram baseados nas concentrações finais de etanol e glicose e frutose para o tempo de 80 h. A seguir estão apresentados os resultados obtidos para os ensaios realizados.

### 5.2.1. Ensaio 1

As condições experimentais do ensaio 1, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11 – Condições experimentais para o ensaio 1.**

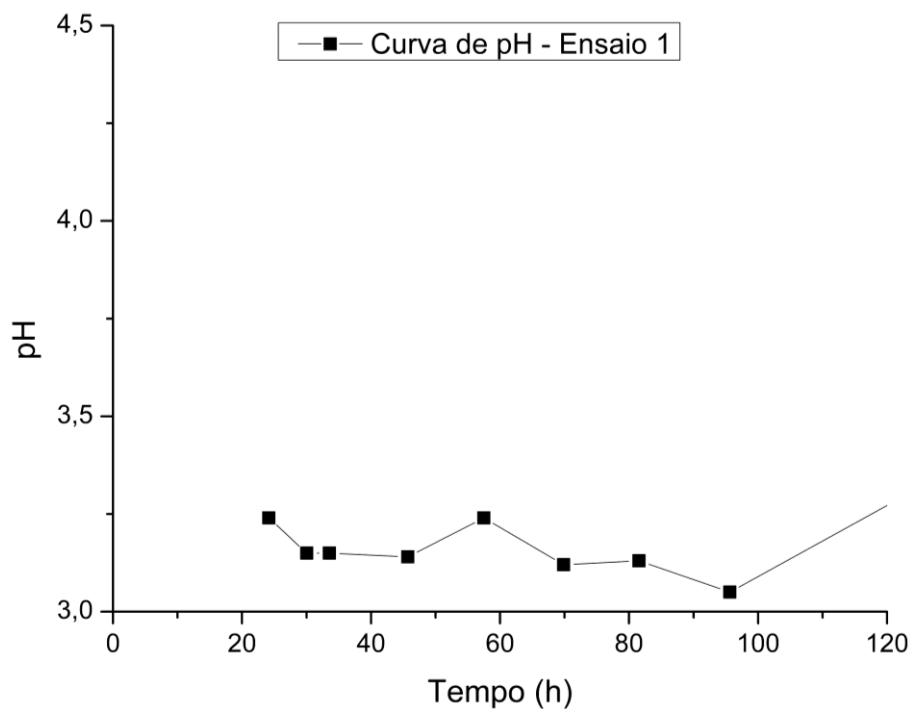
<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1138,08
Volume total (L)	5
Temperatura do banho (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,81
Massa de fermento fresco utilizada (g)	48,01

**Tabela 12 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação do ensaio 1.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	146,42
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	4,43
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	58,10
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,409
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	80,10

#### 5.2.1.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 1 está apresentada na Figura 25.

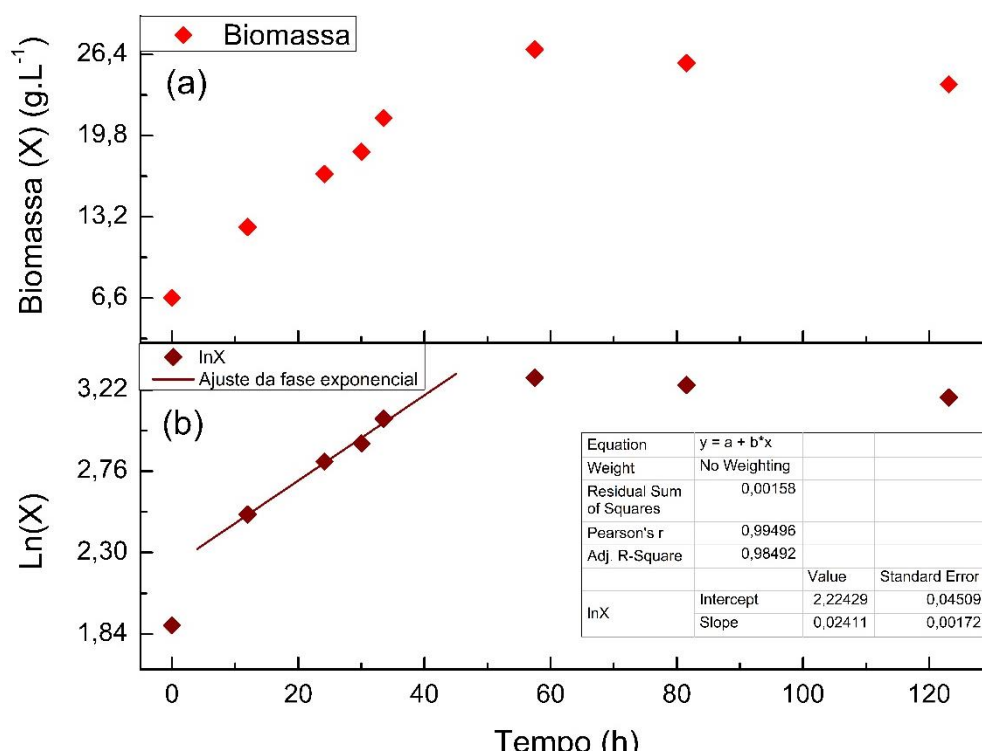


**Figura 25 – Curva de pH para o ensaio 1.**

Por meio do comportamento observado na Figura 25 o pH do ensaio 1 apresentou flutuações entre 3,0 e 3,25.

#### **5.2.1.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 26 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 1.

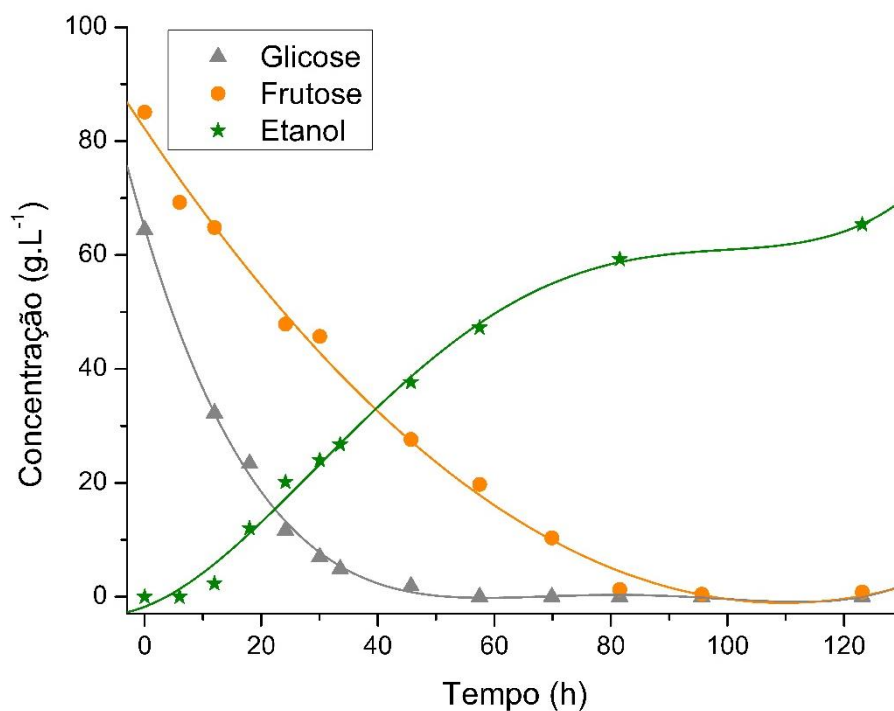


**Figura 26 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logarítmo natural da biomassa (b) para o ensaio 1.**

Para o ensaio 1, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,02411 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 26.b. Observa-se o início da fase estacionária a partir de 45 horas, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 25 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.1.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 1 estão apresentados na Figura 27.

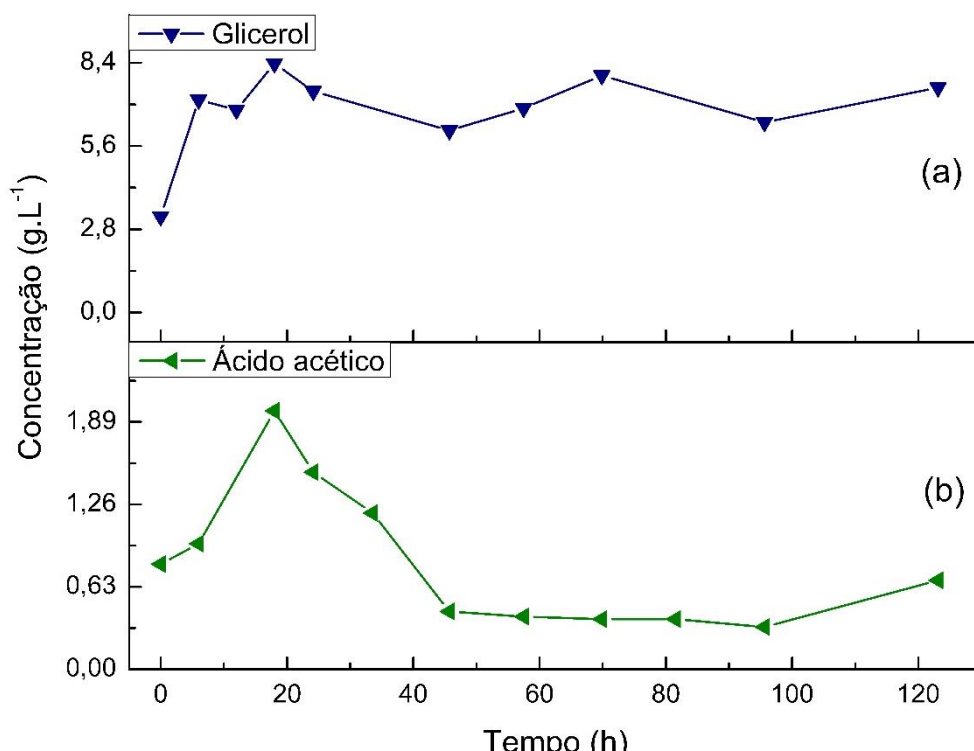


**Figura 27 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 1.**

Inicialmente, a concentração medida para glicose e frutose foi de 64,72 e 81,70 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 146,42 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. O etanol atinge aproximadamente 60 g.L<sup>-1</sup> em 120h de fermentação.

#### **5.2.1.4. Glicerol e Ácido acético**

Os resultados obtidos de concentração de glicerol e ácido acético durante a fermentação do ensaio 1, estão apresentados na Figura 28.



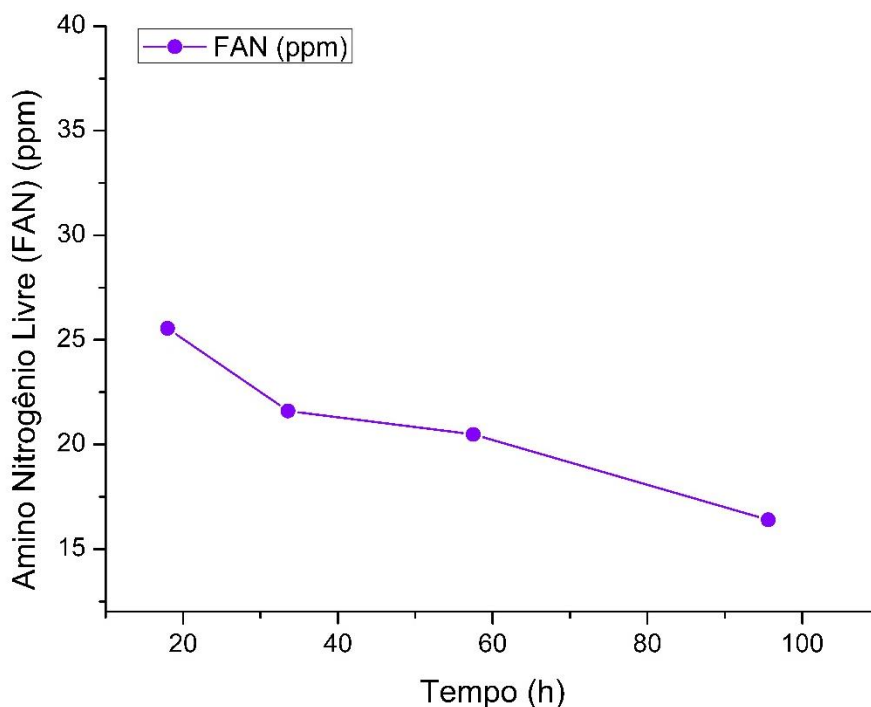
**Figura 28 – Perfil de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 1.**

Há um aumento da concentração de glicerol a partir das 10 horas de fermentação, juntamente com um pico de produção de ácido acético com 20 horas de processo. Esses valores coincidem com a fase exponencial de crescimento microbiano, sugerindo respostas à estresse osmótico, como descrito anteriormente nesse trabalho (Hohman & Mager, 2003). A partir de aproximadamente 40 horas observa-se estabilidade da concentração de ácido acético. As concentrações finais observadas são de 7,56 g.L<sup>-1</sup> para o glicerol e 0,68 g.L<sup>-1</sup> para o ácido acético.

#### **5.2.1.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados obtidos nas análises de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 1 estão apresentados na Figura 29.





**Figura 29 – Resultados para a análise de FAN do ensaio 1.**

O comportamento apresentado na Figura 29 demonstra que mesmo após o fim da fase exponencial há consumo de nitrogênio assimilável pela levedura.

#### 5.2.1.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 1, no tempo de 81,54 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 1 no tempo de 81,54 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	1.104,57
Álcool 2-feniletil	3,02
Álcool isobutílico	8,23
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

Através da Tabela 13 pode-se notar que diversos metabólitos de interesse não foram observados, fato também demonstrado para os demais ensaios. Entretanto, o álcool isoamílico apresentou maior concentração em relação ao álcool 2-feniletil e o álcool isobutílico.

### 5.2.2. Ensaio 2

As condições experimentais do ensaio 2, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 14 e 15.

**Tabela 14 – Parâmetros medidos para o ensaio 2.**

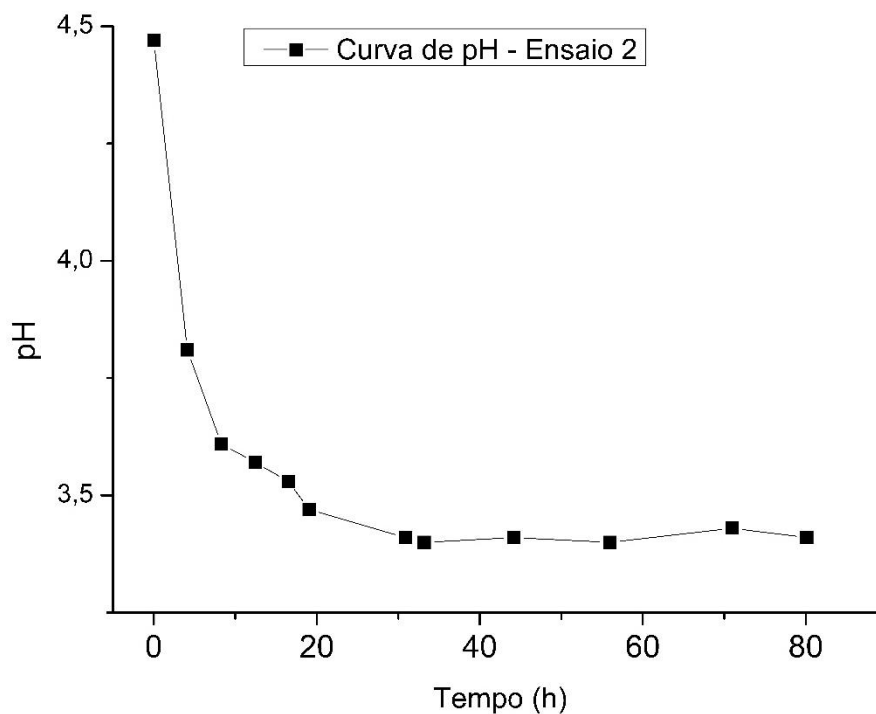
<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1087,11
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,84
Massa de fermento fresco utilizada (g)	50,01

**Tabela 15 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 2.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	146,00
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	11,37
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	54,35
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,404
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	79,00

#### 5.2.2.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 2 está apresentada na Figura 30.

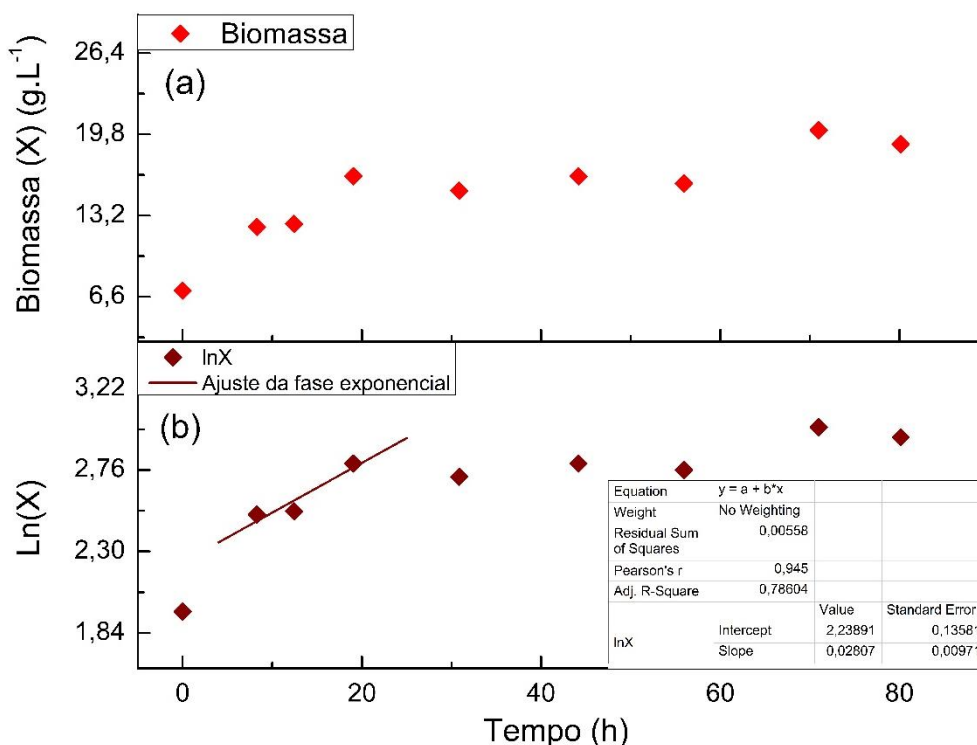


**Figura 30 – Curva de pH para o ensaio 2.**

O pH do mosto de hidromel no início da fermentação foi de 4. Os valores flutuaram entre 3,25 e 3,75 durante todo o processo.

#### **5.2.2.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 31 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 2.

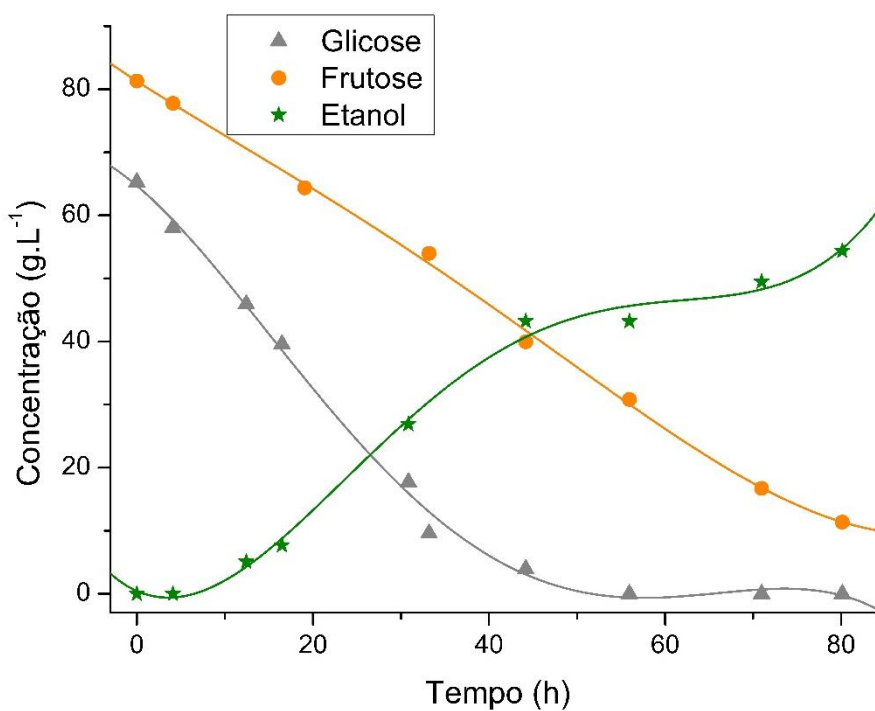


**Figura 31 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da biomassa (b) para o ensaio 2.**

Para o ensaio 2, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,02807 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 31.b. Observa-se o início da fase estacionária a partir de 25 horas, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 20 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.2.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 2 estão apresentados na Figura 32.

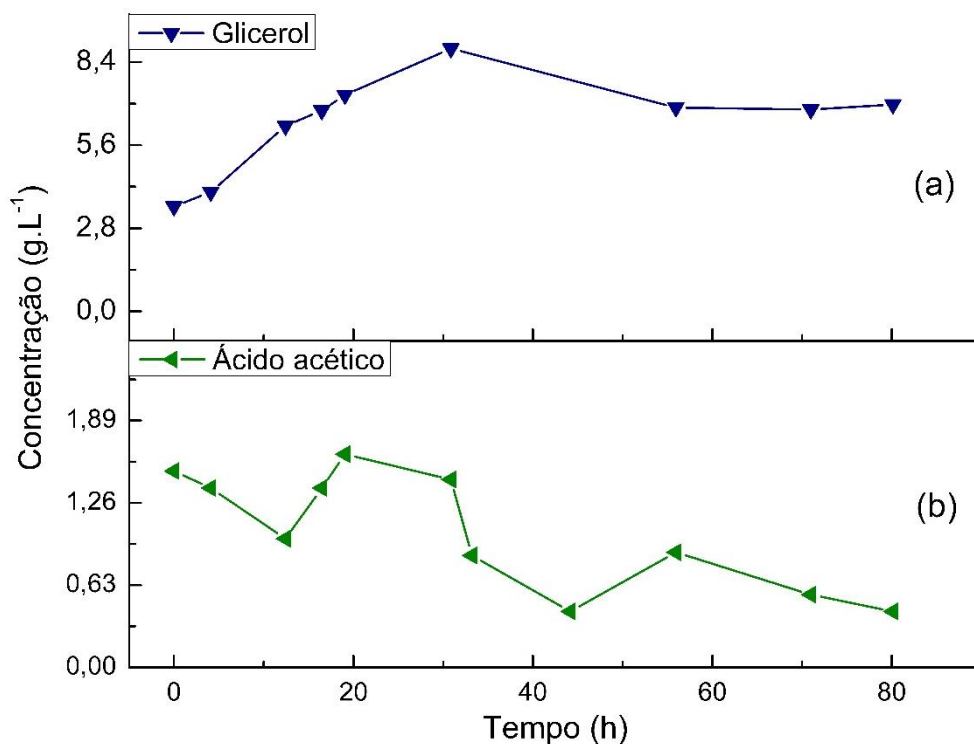


**Figura 32 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 2.**

Inicialmente, a concentração medida para glicose e frutose foi de 65,30 e 81,30 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 146,60 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. O etanol atinge aproximadamente 54,35 g.L<sup>-1</sup> em 80h de fermentação.

#### **5.2.2.4. Glicerol e Ácido acético**

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 2 estão apresentados na Figura 33.

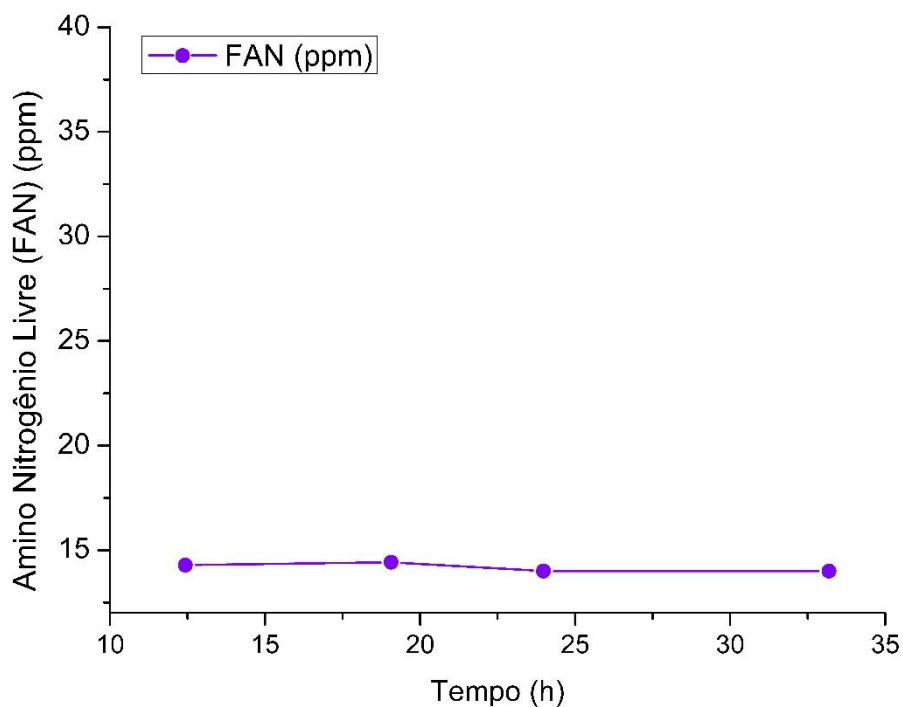


**Figura 33 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 2.**

A concentração de glicerol para o ensaio 2 atinge seu máximo próximo das 30h de fermentação, enquanto o ácido acético apresenta flutuações no mesmo período.

#### **5.2.2.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 2 estão apresentados na Figura 34.



**Figura 34 – Resultados para a análise de FAN do ensaio 2.**

Observa-se que no ensaio 2 a concentração de FAN manteve-se entre 12,5 e 15 ppm durante as primeiras 35 horas de processo.

#### 5.2.2.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 2, no tempo de 55,94 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 16.

**Tabela 16 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 2 no tempo de 55,94 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	52,26
Álcool 2-feniletil	1,10
Álcool isobutílico	Não detectado
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

A produção de voláteis para o ensaio 2 está relacionada apenas à produção de álcool isoamílico e álcool 2-feniletil (Tabela 16).

### 5.2.3. Ensaio 3

As condições experimentais do ensaio 3, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 17 e 18.

**Tabela 17 – Parâmetros medidos para o ensaio 3.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1449,14
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,82
Massa de fermento fresco utilizada (g)	49,99

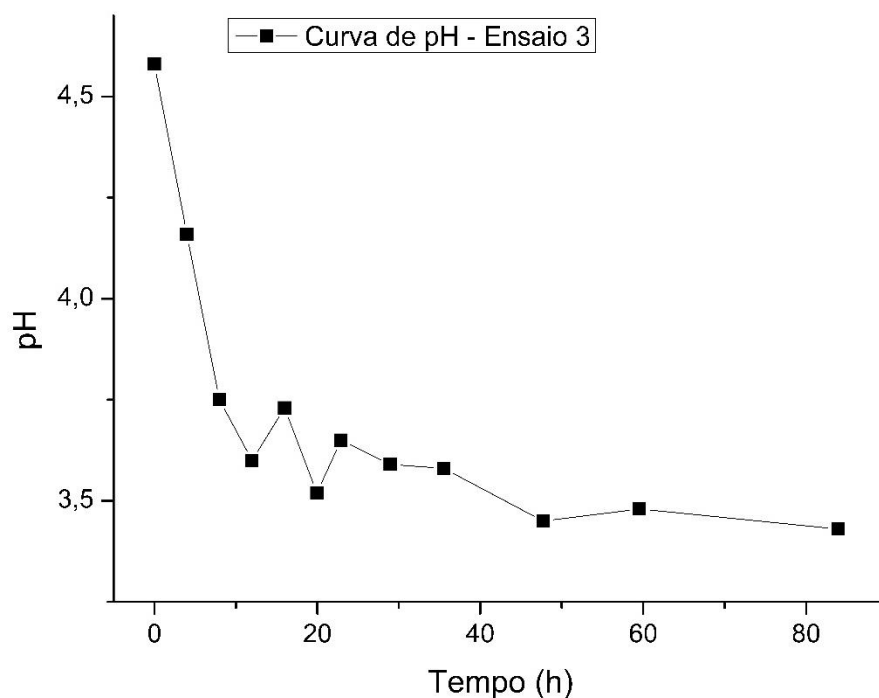
**Tabela 18 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 3.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	200
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	33,00
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	10,79
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,065
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	12,64

#### 5.2.3.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 3 está apresentada na Figura 35.



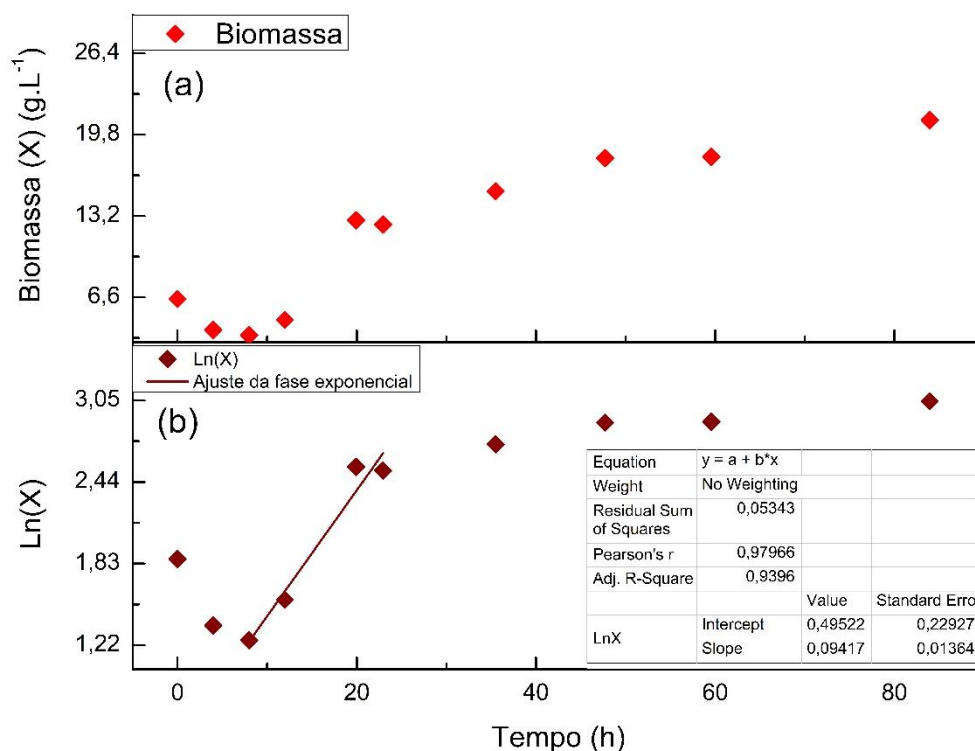


**Figura 35 – Curva de pH para o ensaio 3.**

O pH do ensaio 3 apresentou rápida queda nas primeiras 20h de fermentação e flutuações entre 3,25 e 3,75 até o fim do processo.

#### **5.2.3.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 36 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 3.

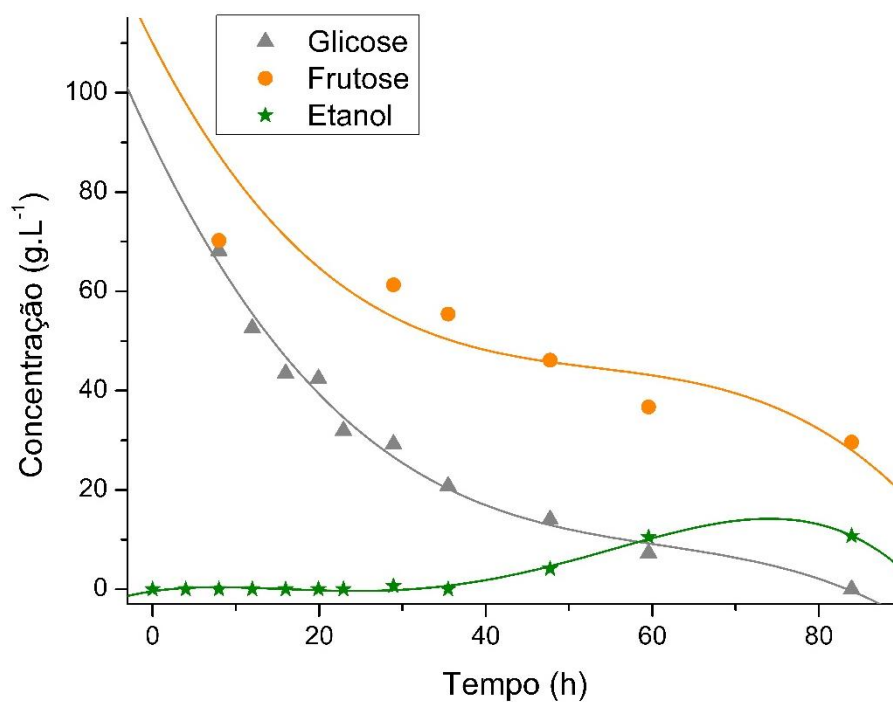


**Figura 36 – Dados experimentais da concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 3.**

Para o ensaio 3, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,09417 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 36.b. Observa-se um declínio da concentração de biomassa até 10h e um rápido crescimento até o início da fase estacionária a partir de 20 horas, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 15 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.3.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 3 estão apresentados na Figura 37.

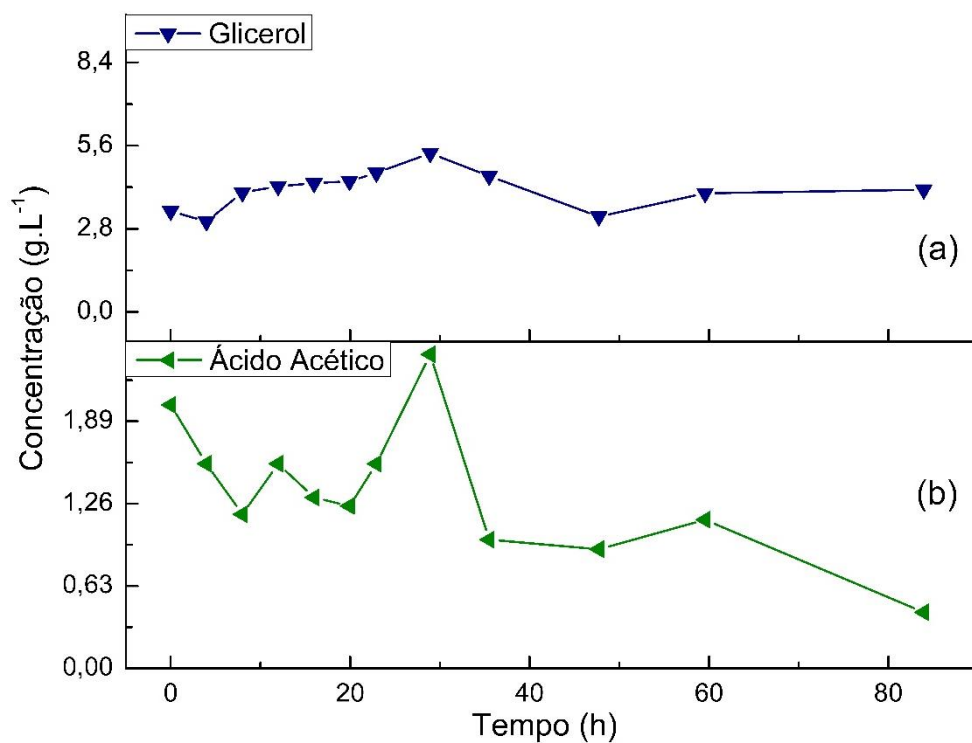


**Figura 37 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 3.**

Inicialmente, a concentração previstas para glicose e frutose foram de 100 e 120 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 220 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. O etanol atinge aproximadamente 18 g.L<sup>-1</sup> em 80h de fermentação.

#### **5.2.3.4. Glicerol e Ácido acético**

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 3 estão apresentados na Figura 38.

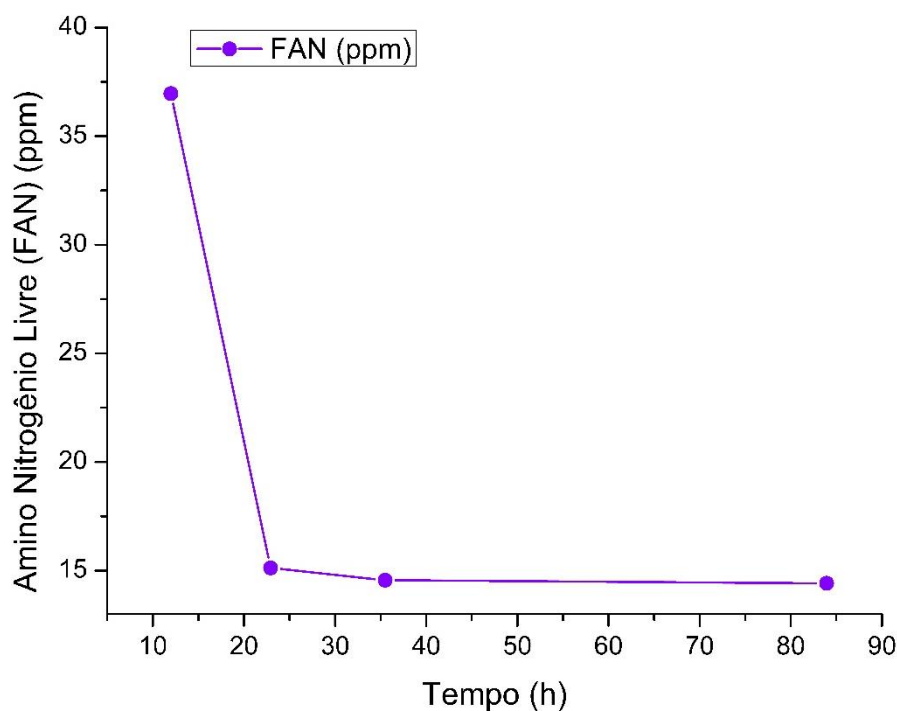


**Figura 38 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 3.**

A concentração de glicerol atinge seu máximo próximo das 30 h de fermentação, apresentando um pico. A concentração de ácido acético também apresenta um pico nesse mesmo período e flutua durante as primeiras 40 h.

#### **5.2.3.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 3 estão apresentados na Figura 39.



**Figura 39 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 3.**

Observa-se que no ensaio 3 a concentração de FAN apresenta um rápido declínio, indo de 37 ppm iniciais para 15 ppm nas primeiras 20 h de fermentação.

#### 5.2.3.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 3, no tempo de 59,56 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 19.

**Tabela 19 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 3 no tempo de 59,56 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	165,19
Álcool 2-feniletil	Não detectado
Álcool isobutílico	Não detectado
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

Para o ensaio 3 observa-se que a única substância detectada foi o álcool isoamílico na concentração de 165,19 ppm.

#### 5.2.4. Ensaio 4

As condições experimentais do ensaio 4, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 20 e 21.

**Tabela 20 – Parâmetros medidos para o ensaio 4.**

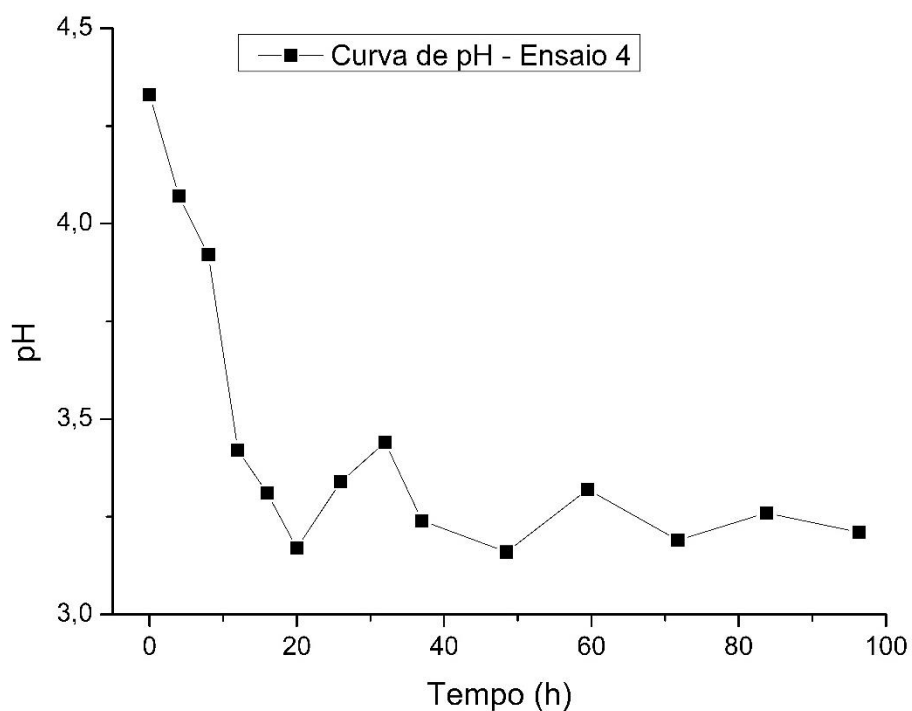
<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1088,53
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,80
Massa de fermento fresco utilizada (g)	50,08

**Tabela 21 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 4.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	180,72
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	8,70
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	46,5
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,270
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	52,9

##### 5.2.4.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 4 está apresentada na Figura 40.

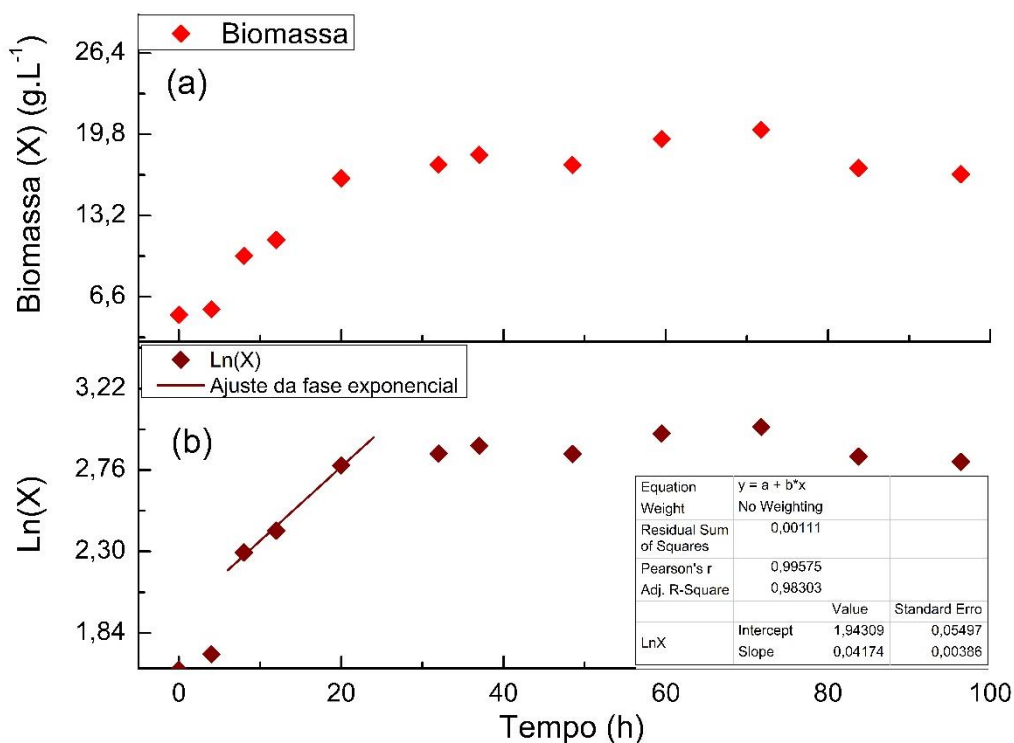


**Figura 40 – Curva de pH para o ensaio 4.**

Observa-se queda do pH no ensaio 4 até 20 h de fermentação, a partir desse momento o pH flutua até o fim do processo.

#### **5.2.4.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 41 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 4.



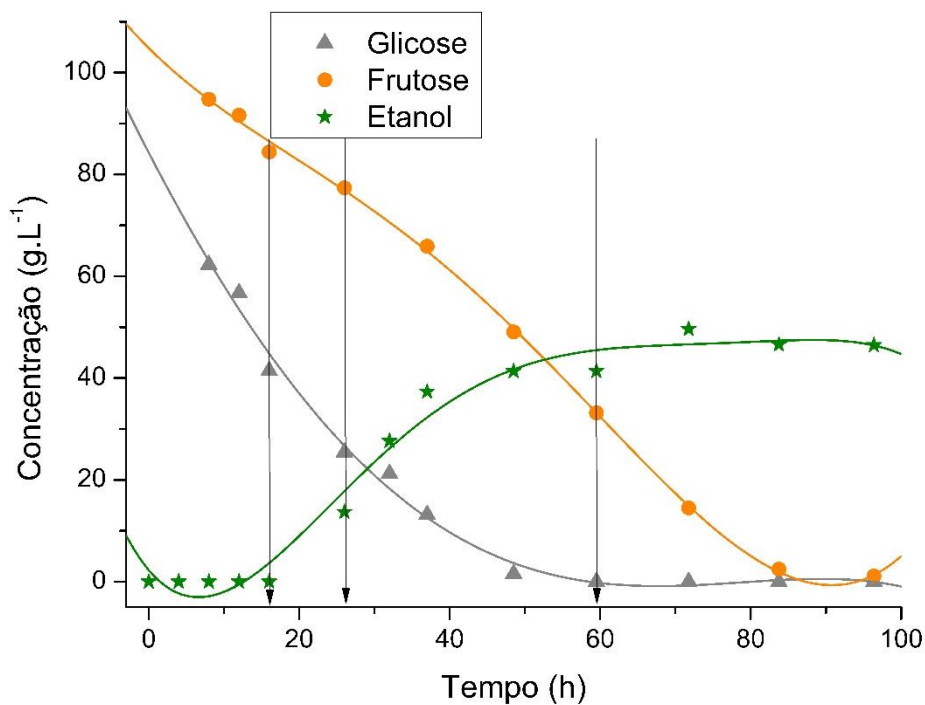
**Figura 41 – Dados experimentais de biomassa (a) e o logarítimo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 4.**

Para o ensaio 4, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,04174 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 41.b. Observa-se crescimento até 20 h de fermentação, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 18 \text{ g.L}^{-1}$ ).

#### **5.2.4.3. Glicose, Frutose e Etanol**

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 4 estão apresentados na Figura 42.



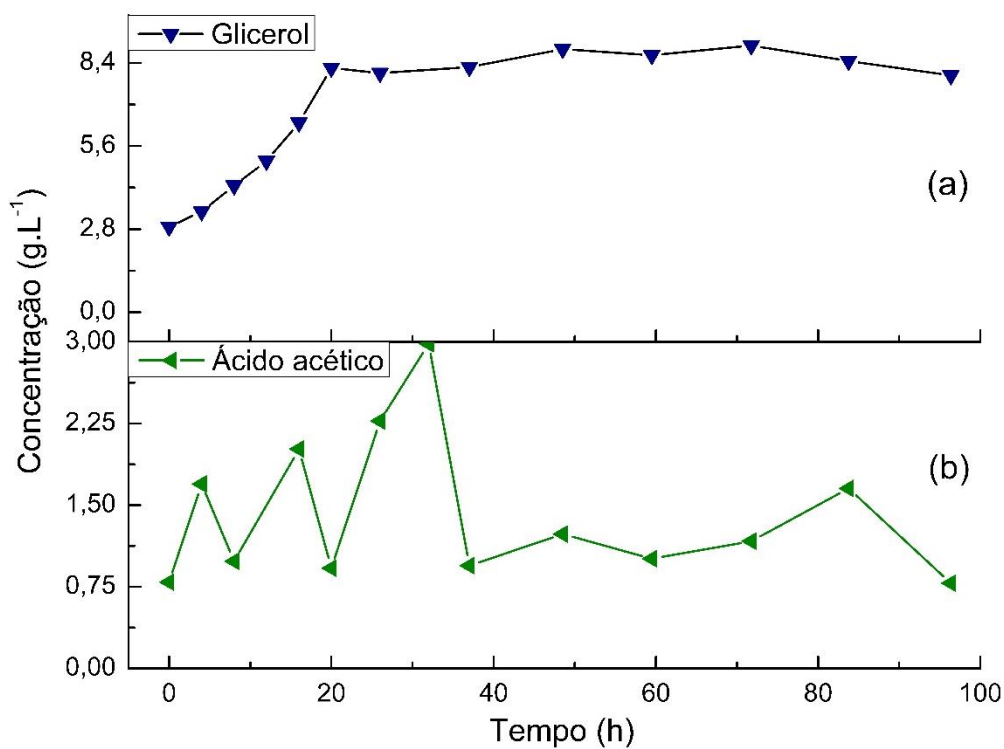


**Figura 42 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 4. As flechas indicam os momentos das adições de nutrientes.**

Inicialmente, a concentração previstas para glicose e frutose foram de 92 e 110 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 202 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. O etanol atinge aproximadamente 45 g.L<sup>-1</sup> em 100 h de fermentação.

#### 5.2.4.4. Glicerol e Ácido acético

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 4 estão apresentados na Figura 43.

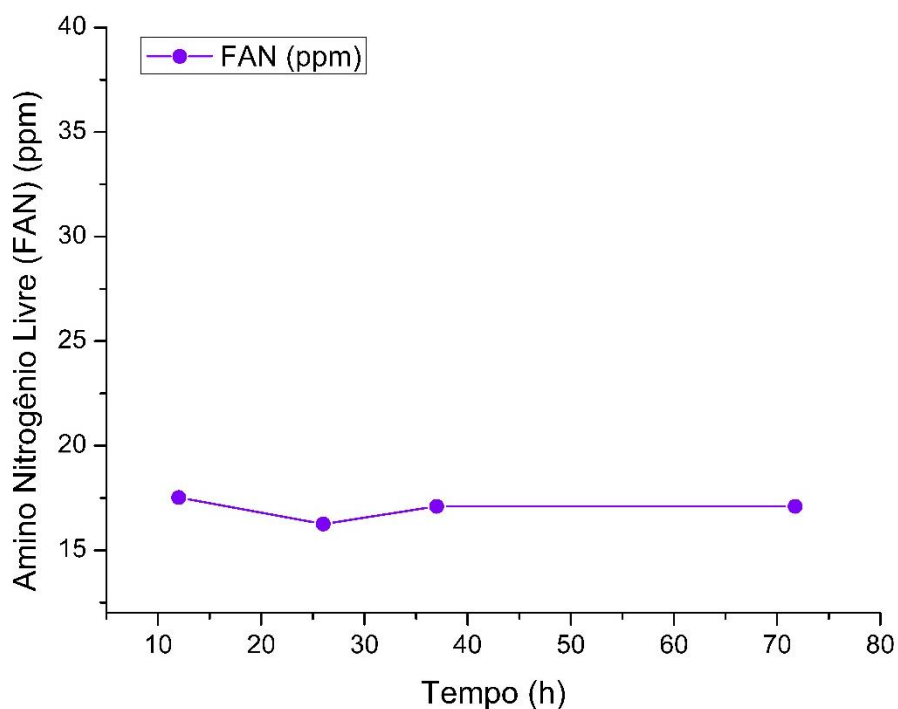


**Figura 43 – Perfil de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 4.**

A concentração de glicerol atinge seu máximo próximo das 20 h de fermentação. A concentração de ácido acético varia entre 0,75 e 3 g.L<sup>-1</sup> até 40 h de fermentação.

#### **5.2.4.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 4 estão apresentados na Figura 44.



**Figura 44 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 4.**

A concentração de FAN para o ensaio 4 demonstra poucas variações ao longo de todo o ensaio, mantendo-se próximo de 17 ppm.

#### 5.2.4.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 4, no tempo de 59,5 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 22.

**Tabela 22 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 4 no tempo 59,5 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	302,26
Álcool 2-feniletil	1,82
Álcool isobutílico	Não detectado
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

Observa-se a detecção de álcool isoamílico e álcool 2-feniletíl, nas concentrações de 302,26 e 1,82 ppm.

### 5.2.5. Ensaio 5

As condições experimentais do ensaio 5, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 23 e 24.

**Tabela 23 – Parâmetros medidos para o ensaio 5.**

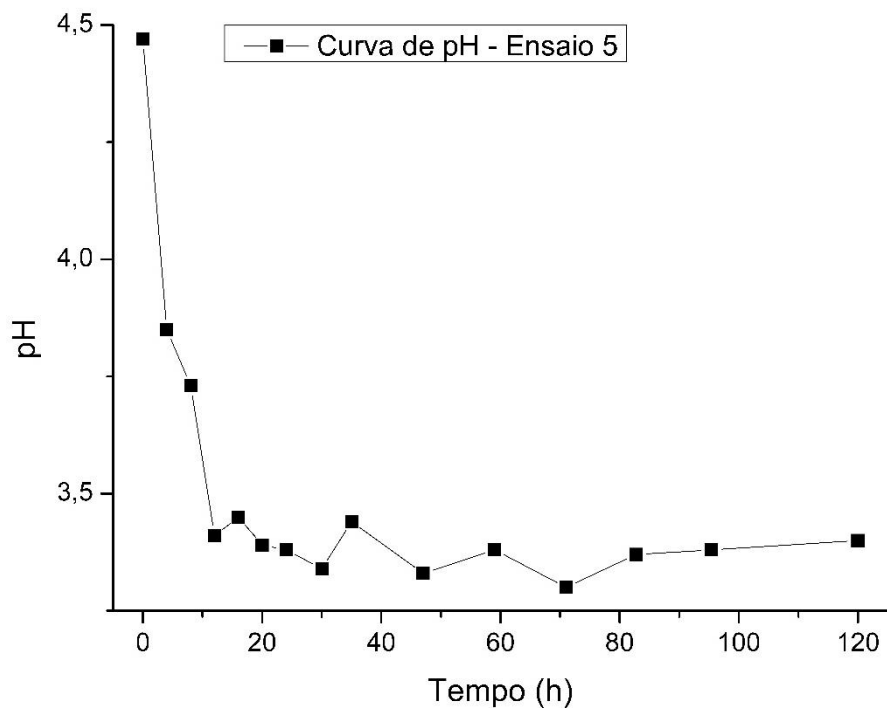
<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1449,84
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,83
Massa de fermento fresco utilizada (g)	49,97

**Tabela 24 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 5.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	292,53
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	26,13
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	97,49
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,366
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	72,62

#### 5.2.5.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 5 está apresentada na Figura 45.

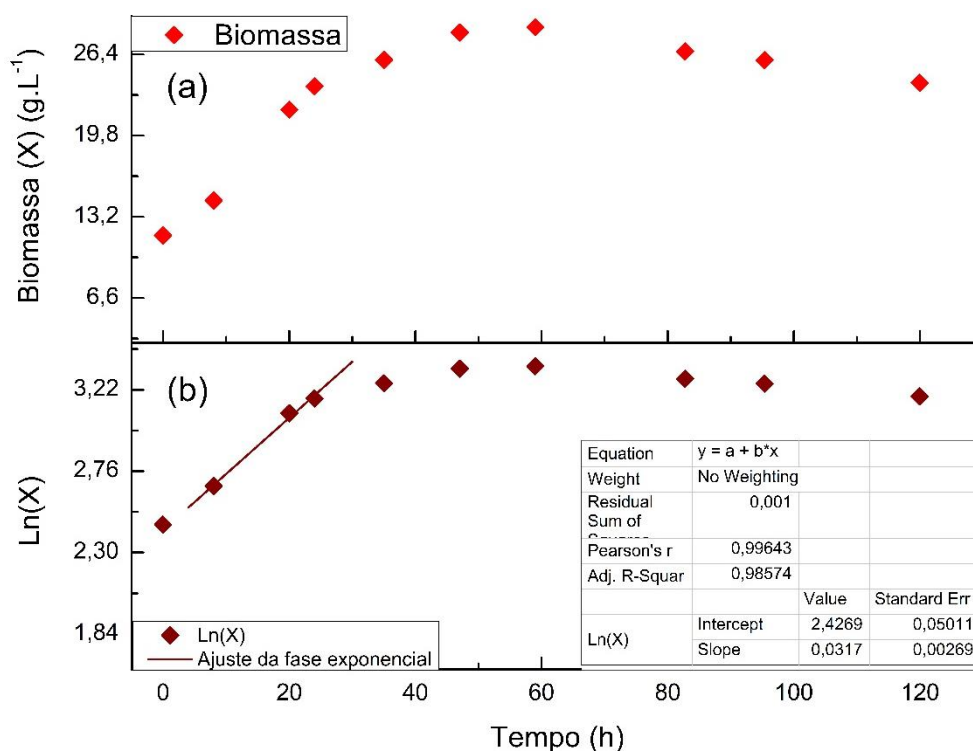


**Figura 45 – Curva de pH para o ensaio 5.**

Observa-se queda do pH no ensaio 5 até 10 h de fermentação, a partir desse momento o pH flutua entre 3,1 e 3,25 até o fim do processo.

#### **5.2.5.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 46 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 5.

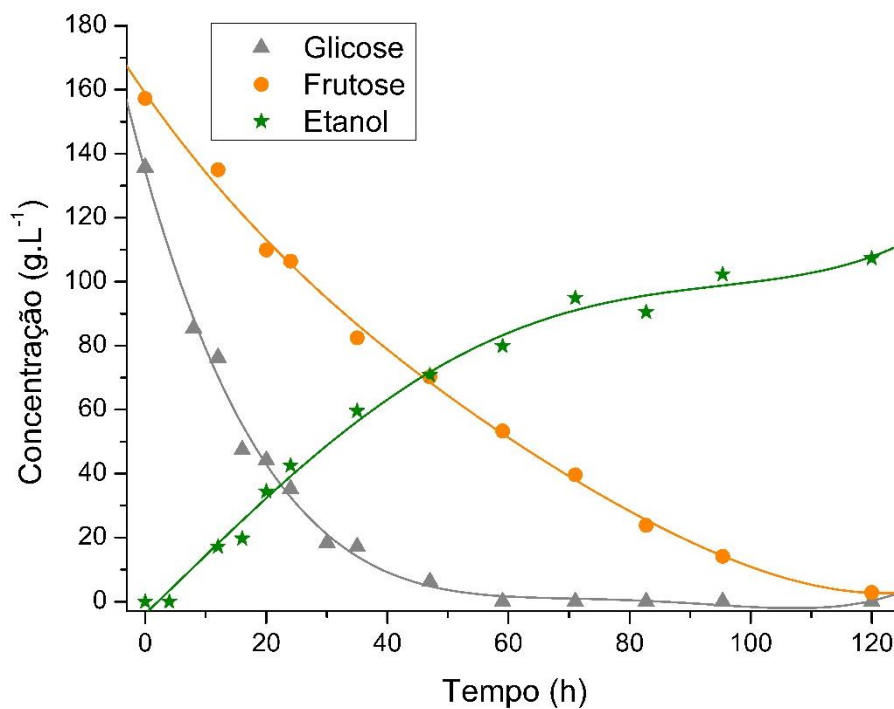


**Figura 46 – Dados experimentais da concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 5.**

Para o ensaio 5, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,0317 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 46.b. Nota-se uma fase exponencial bem definida até 20h de fermentação, porém observa-se crescimento até 60 h de fermentação, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 27 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.5.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 5 estão apresentados na Figura 47.

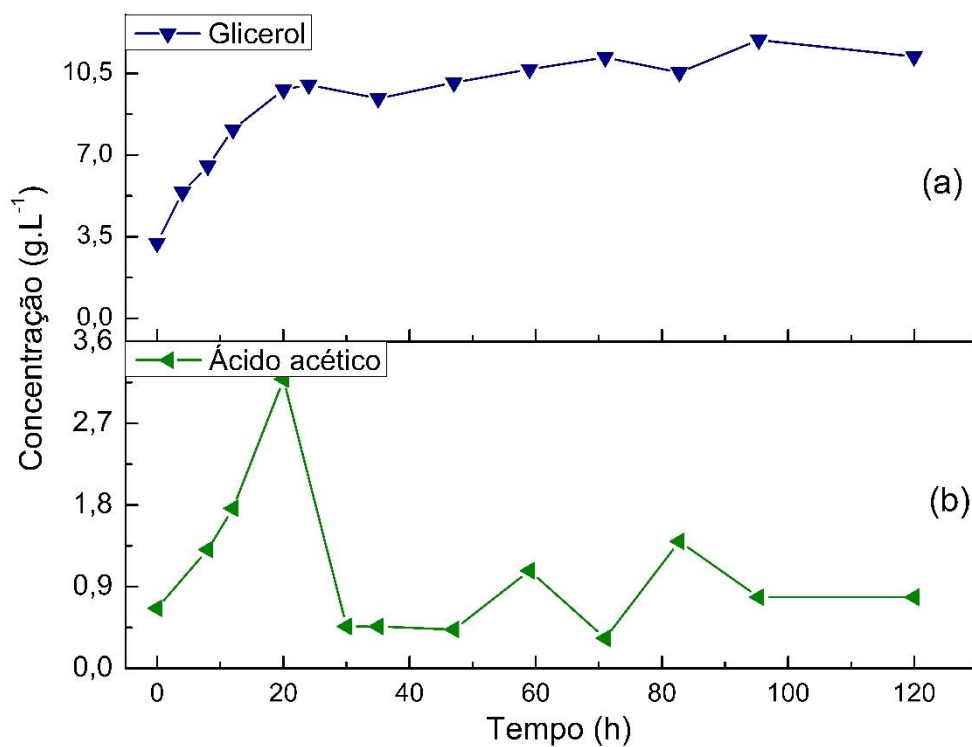


**Figura 47 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 5.**

Inicialmente, a concentração para glicose e frutose foram de 138 e 160 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 298 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. O etanol atinge aproximadamente 100 g.L<sup>-1</sup> em 120 h de fermentação.

#### **5.2.5.4. Glicerol e Ácido acético**

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 5 estão apresentados na Figura 48.



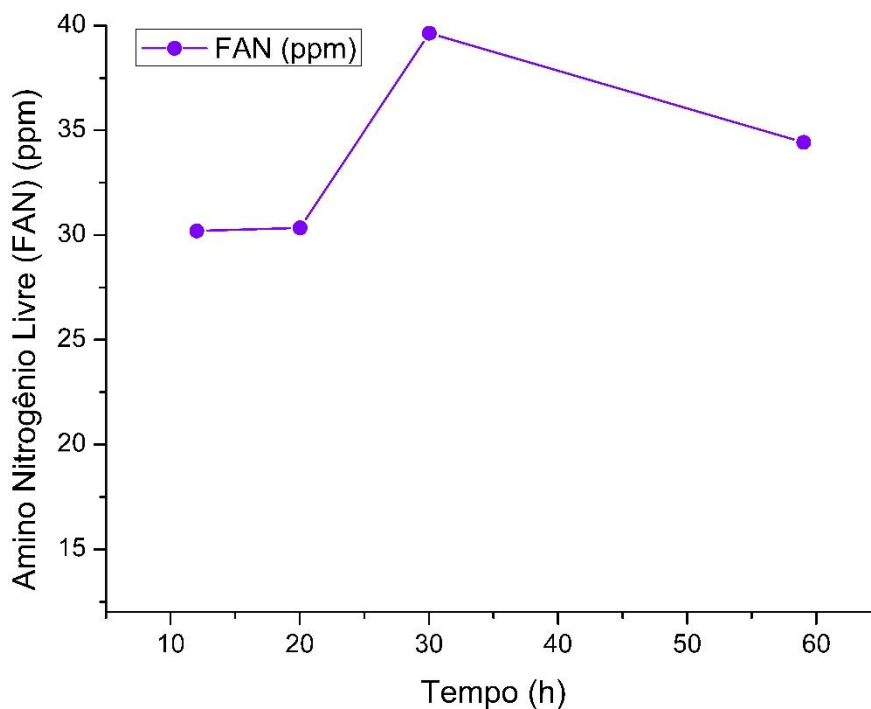
**Figura 48 – Perfis de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 5.**

A concentração de glicerol aumenta nas primeiras 20 h e atinge 10,5 g.L<sup>-1</sup> próximo das 100 h. A concentração de ácido acético apresenta um pico a 20 h e flutua entre 0,4 e 0,9 até o fim da fermentação.

#### **5.2.5.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 5 estão apresentados na Figura 49.





**Figura 49 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 5.**

A concentração de FAN para o ensaio 5 demonstra um pico de nitrogênio próximo das 30 horas e um decaimento entre 30 e 60 h, voltando à concentração próxima da inicial (35 ppm).

#### **5.2.5.6. Análise de Voláteis**

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 5, no tempo de 47 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 25.

**Tabela 25 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 5 no tempo de 47 horas de fermentação.**

<b>Substância volátil</b>	<b>Concentração (ppm)</b>
Álcool isoamílico	1.018,36
Álcool 2-feniletil	8,67
Álcool isobutílico	Não detectado
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

No ensaio 5 observa-se concentração de álcool isoamílico de 1.018,36 ppm, bem como álcool 2-feniletil de 8,67 ppm.

#### **5.2.6. Ensaio 6**

As condições experimentais do ensaio 6, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 26 e 27.

**Tabela 26 – Parâmetros medidos para o ensaio 6.**

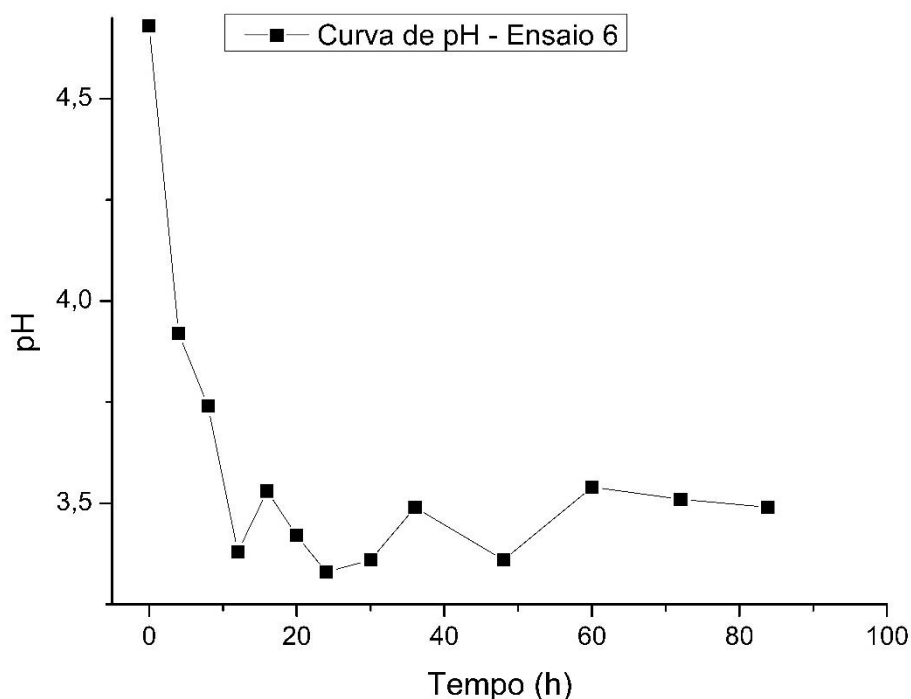
<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1068,07+307,6
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,80
Massa de fermento fresco utilizada (g)	50,60

**Tabela 27 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 6.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	126,63+36,47
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	9,69
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	70,05
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,457
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	89,35

### 5.2.6.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 6 está apresentada na Figura 50.



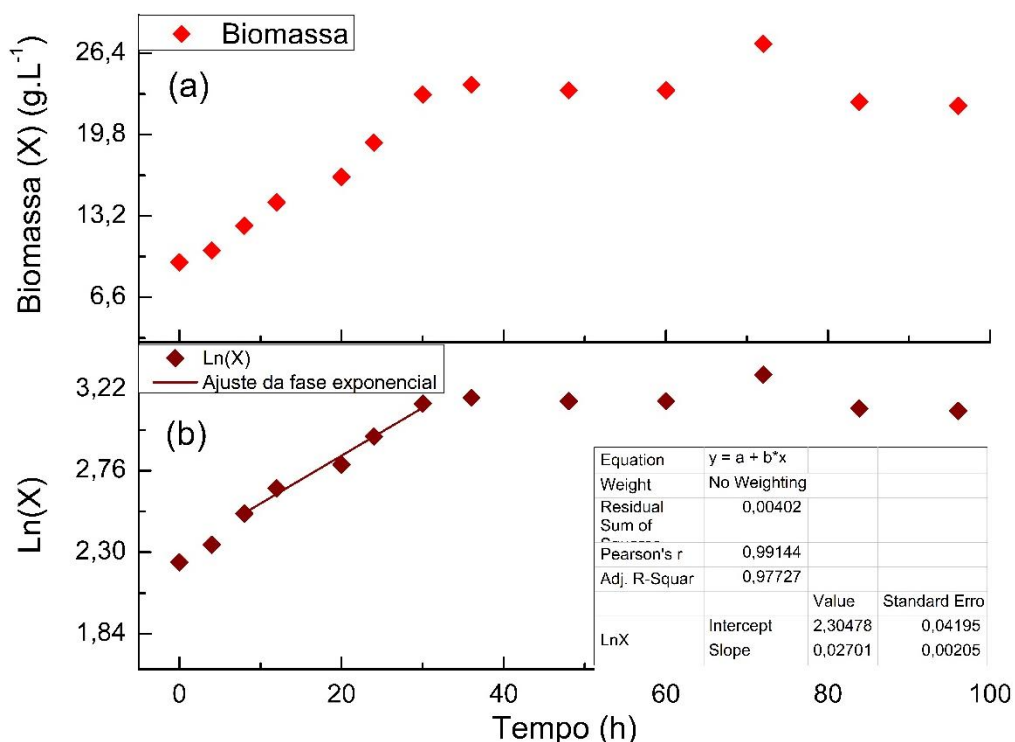
**Figura 50 – Curva de pH para o ensaio 6.**

Observa-se no ensaio 6 o rápido declínio do pH nas primeiras 10 h de fermentação. A partir desse momento o pH flutua entre 3,1 e 3,5 até o fim da fermentação.

### 5.2.6.2. Biomassa

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 51 estão apresentados os dados experimentais de

concentração de biomassa e do logarítmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 6.

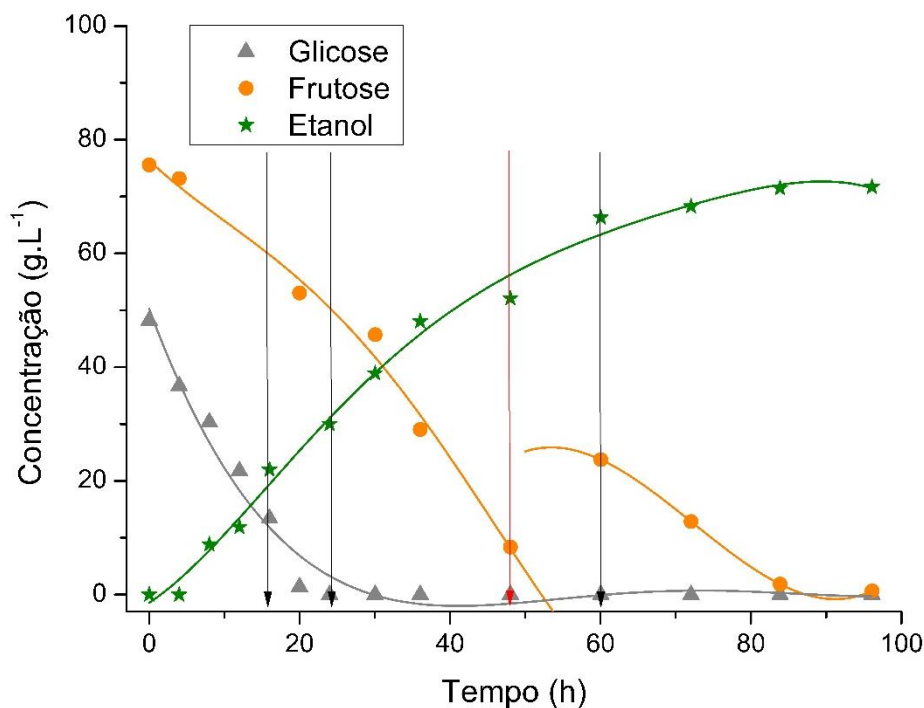


**Figura 51 – Dados experimentais para a concentração de biomassa (a) e o logarítmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 6.**

Para o ensaio 6, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,02701 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 51.b. Nota-se uma fase exponencial bem definida até 30h, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 23 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.6.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 6 estão apresentados na Figura 52.

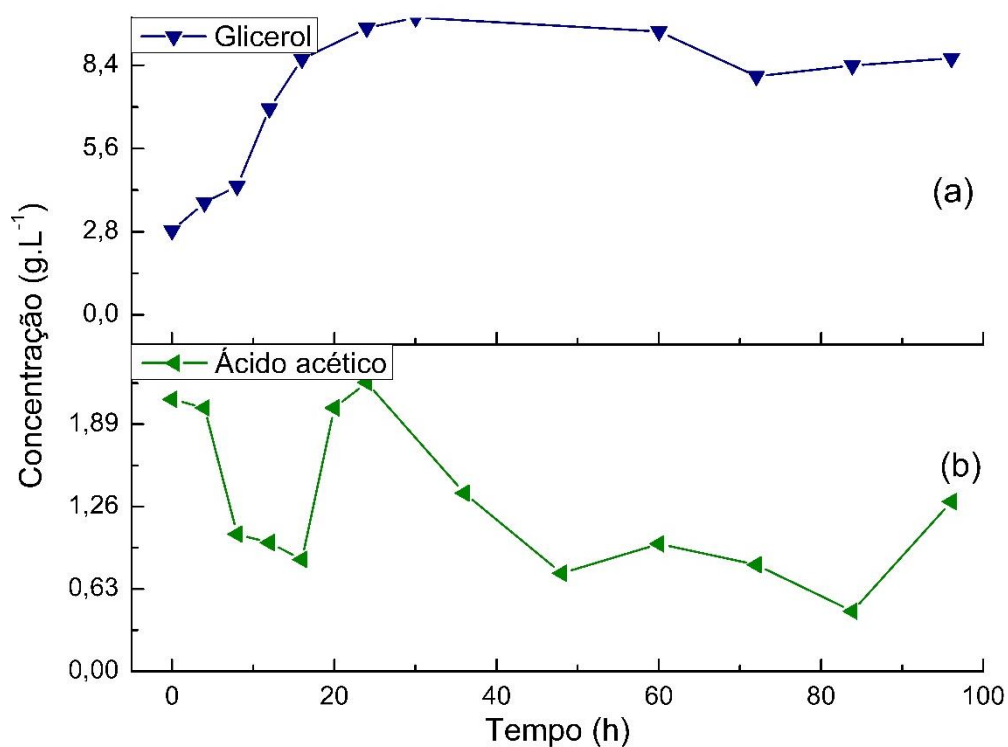


**Figura 52 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 6. As flechas pretas representam os momentos de adição de nutrientes e a flecha vermelha o momento da realimentação de mel.**

Inicialmente, a concentração para glicose e frutose foram de 50 e 78 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 128 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. Posteriormente estima-se que foi adicionado 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 30 g.L<sup>-1</sup> de frutose, aproximadamente. O etanol atinge aproximadamente 78 g.L<sup>-1</sup> em 100 h de fermentação.

#### **5.2.6.4. Glicerol e Ácido acético**

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 6 estão apresentados na Figura 53.

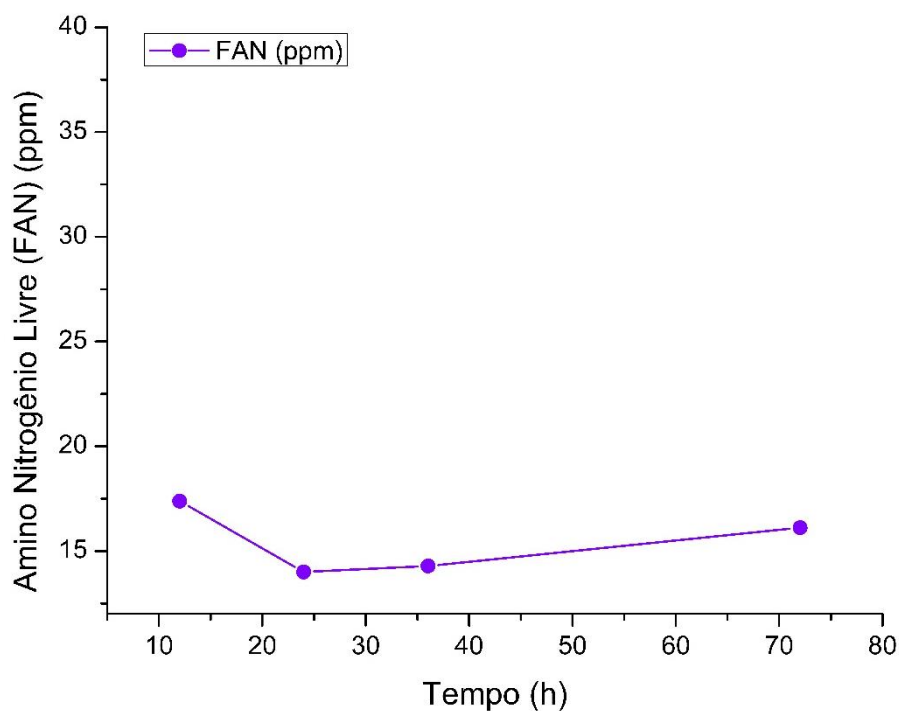


**Figura 53 – Perfis de concentração para glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 6.**

A concentração de glicerol aumenta nas primeiras 20 h e atinge 11,2 g.L<sup>-1</sup> entre 20 e 60 h. A concentração de ácido acético apresenta flutuações, porém apresenta maior concentração próximo das 25 h de fermentação.

#### **5.2.6.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 6 estão apresentados na Figura 54.



**Figura 54 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 6.**

A concentração de FAN para o ensaio 6 apresentou pouca variação, indo de 17 ppm a 12 ppm, com declínio entre 10 e 25 h.

#### 5.2.6.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 6, no tempo de 60 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 28.

**Tabela 28 – Concentração de voláteis detectadas no ensaio 6 no tempo de 60 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	441,94
Álcool 2-feniletil	1,42
Álcool isobutílico	7,55
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

O ensaio 6 apresentou produção de álcool isoamílico de 441,94 ppm e de álcool 2-feniletil e álcool isobutílico de 1,42 e 7,55 ppm, respectivamente.

### 5.2.7. Ensaio 7

As condições experimentais do ensaio 7, bem como os valores de glicose e frutose totais e residuais, etanol final e rendimento e eficiência em etanol estão apresentados nas Tabelas 29 e 30.

**Tabela 29 – Parâmetros medidos para o ensaio 7.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Massa de mel pesada utilizada (g)	1068,24+333,34
Volume total (L)	5
Temperatura de controle (°C)	22
Quantidade de nutriente utilizada (g)	1,87
Massa de fermento fresco utilizada (g)	50,08

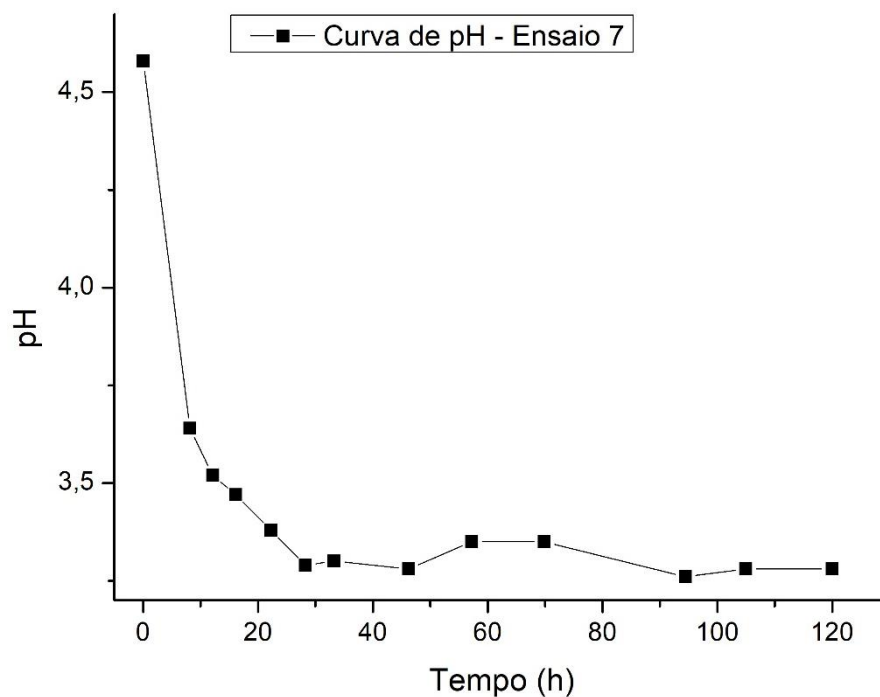
**Tabela 30 – Glicose e frutose totais e residuais, etanol final, rendimento e eficiência em etanol para 80 horas de fermentação para o ensaio 7.**

<b>Glicose e frutose iniciais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	98,40+30,71
<b>Glicose e frutose residuais (g.L<sup>-1</sup>)</b>	17,31
<b>Etanol final (g.L<sup>-1</sup>)</b>	27,98
<b>Rendimento em etanol (g/g)</b>	0,250
<b>Eficiência em etanol (%)</b>	48,96

#### 5.2.7.1. pH ao longo da fermentação

O comportamento do pH para o ensaio 7 está apresentado na Figura 55.



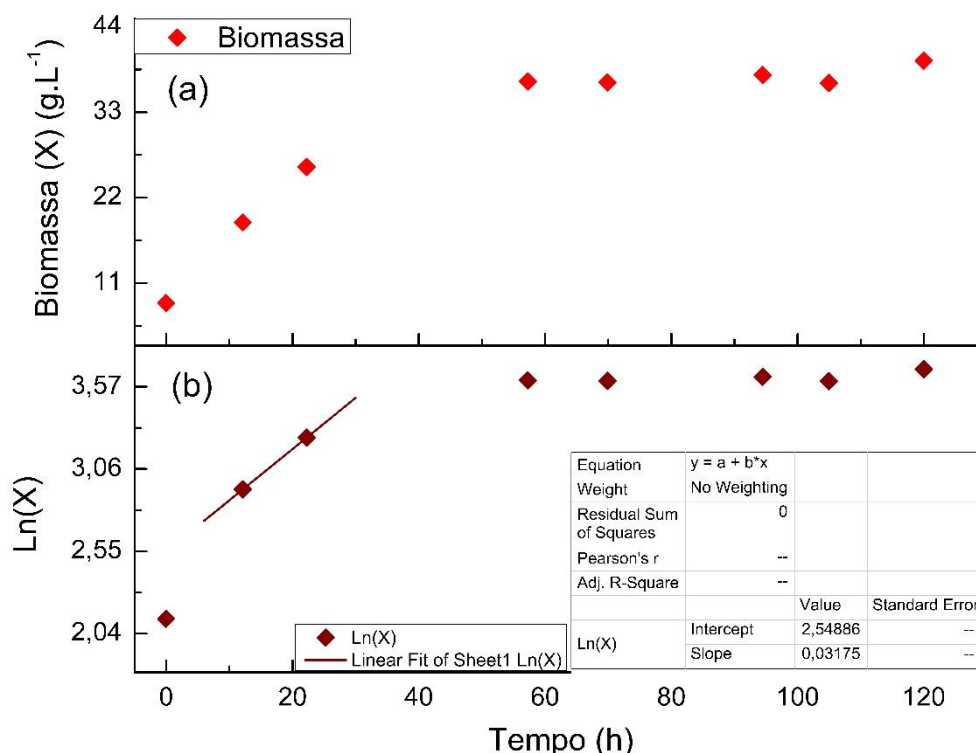


**Figura 55 – Curva de pH para o ensaio 7.**

O pH para o ensaio 7 diminui até 30 h, atingindo 3,2. A seguir flutua entre 3,2 e 3,4 até o fim da fermentação.

#### **5.2.7.2. Biomassa**

Aplicando o logaritmo natural na concentração de biomassa pode-se definir a fase exponencial de crescimento microbiano, como definido nas Equações 03 e 04. Na Figura 56 estão apresentados os dados experimentais de concentração de biomassa e do logaritmo natural da biomassa, ao longo do tempo, para o ensaio 7.

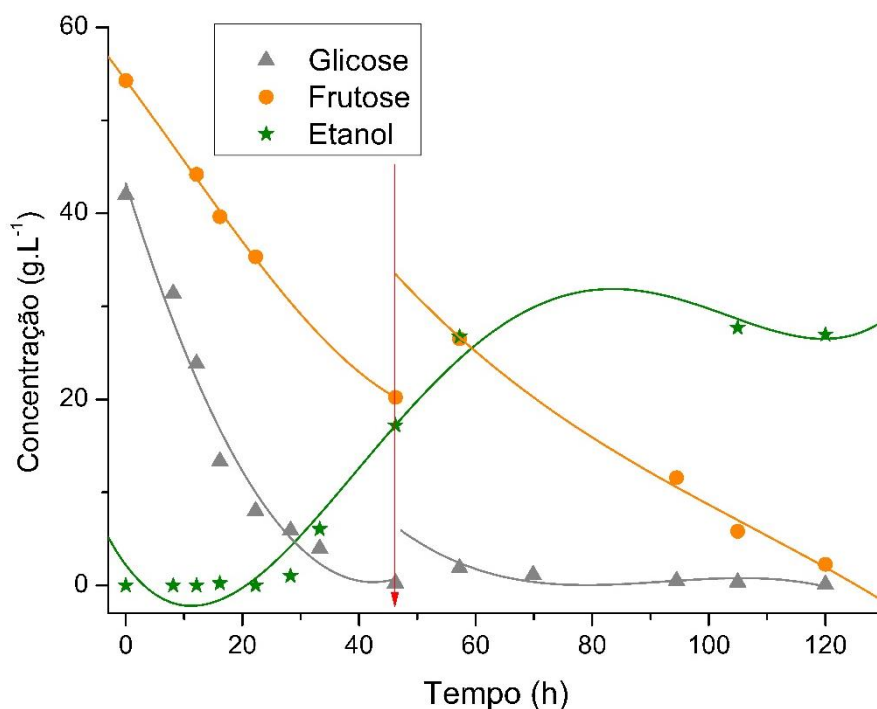


**Figura 56 – Dados experimentais de concentração de biomassa (a) e o logaritmo natural da concentração de biomassa (b) para o ensaio 7.**

Para o ensaio 7, a velocidade específica de crescimento da fase exponencial foi de  $0,03175 \text{ h}^{-1}$ , obtida pela regressão linear da Figura 56.b. Estima-se uma fase exponencial até 30h, momento que a concentração celular atinge seu máximo ( $\approx 37 \text{ g.L}^{-1}$ ).

### 5.2.7.3. Glicose, Frutose e Etanol

O consumo dos substratos principais do mel e a produção de etanol para o ensaio 7 estão apresentados na Figura 57.

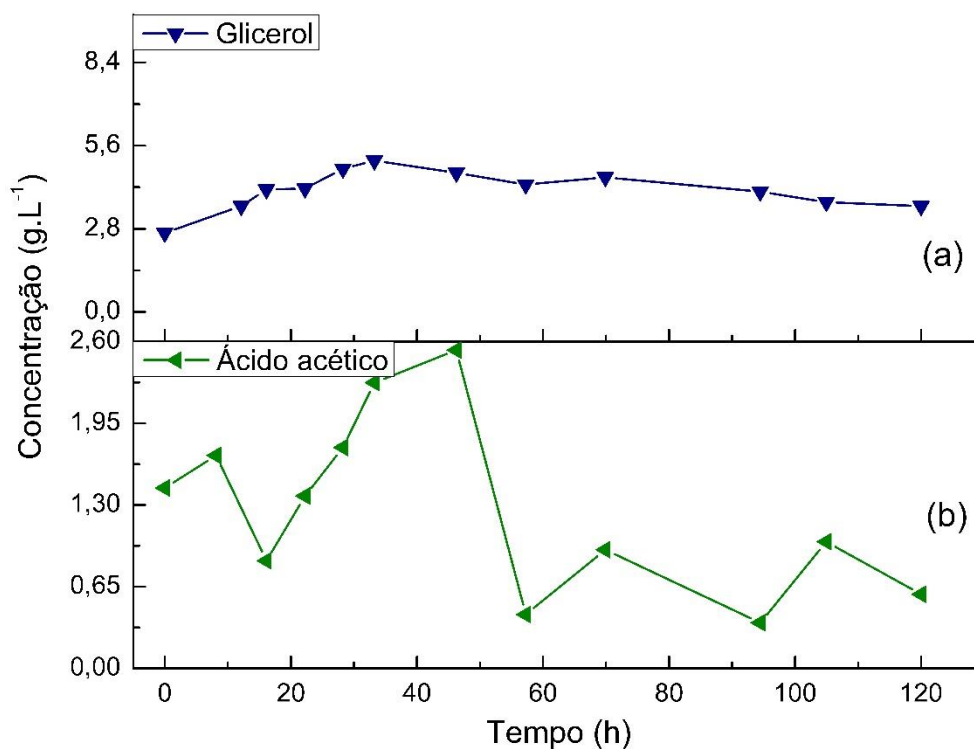


**Figura 57 – Consumo de glicose, frutose e produção de etanol para o ensaio 7.**

Inicialmente, a concentração para glicose e frutose foram de 42 e 57 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, somando 99 g.L<sup>-1</sup> de açúcares principais. Posteriormente estima-se que foi adicionado 9 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 35 g.L<sup>-1</sup> de frutose, aproximadamente. O etanol atinge aproximadamente 29 g.L<sup>-1</sup> em 120 h de fermentação.

#### **5.2.7.4. Glicerol e Ácido acético**

Os dados experimentais para as concentrações de glicerol e ácido acético do ensaio 7 estão apresentados na Figura 58.

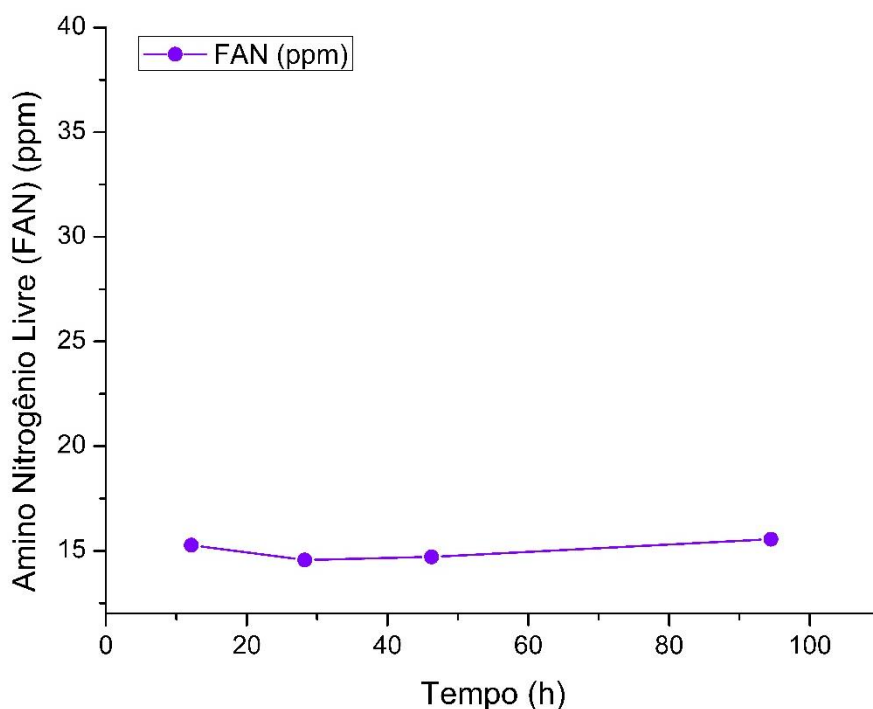


**Figura 58 – Perfis de concentração de glicerol (a) e ácido acético (b) para o ensaio 7.**

A concentração de glicerol aumenta nas primeiras 30 h e atinge 4,8 g.L<sup>-1</sup> nesse período. A concentração de ácido acético apresenta flutuações, porém apresenta maior concentração próximo das 45 h de fermentação.

#### **5.2.7.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Os resultados para a análise de amino nitrogênio livre (FAN) para o ensaio 7 estão apresentados na Figura 59.



**Figura 59 – Resultados da análise de FAN para o ensaio 7.**

A concentração de FAN para o ensaio 7 demonstra poucas variações ao longo de todo o ensaio, mantendo-se próximo de 15 ppm.

#### 5.2.7.6. Análise de Voláteis

As substâncias voláteis analisadas para o ensaio 7, no tempo de 69,88 horas de fermentação estão apresentadas na Tabela 31.

**Tabela 31 – Concentração de voláteis detectadas na ensaio 7 no tempo de 69,88 horas de fermentação.**

Substância volátil	Concentração (ppm)
Álcool isoamílico	746,18
Álcool 2-feniletil	43,72
Álcool isobutílico	Não detectado
Acetato de etila	Não detectado
1-propanol	Não detectado
Acetato de isoamila	Não detectado
Hexanoato de etila	Não detectado
1-pentanol	Não detectado
Octanoato de etila	Não detectado
Acetato 2-feniletil	Não detectado
Acetaldeído	Não detectado

O ensaio 7 apresentou álcool isoamílico na concentração de 746,18 ppm e álcool 2-feniletil na concentração de 43,72 ppm.

### **5.3. Discussão dos Ensaos Fermentativos**

#### **5.3.1. pH**

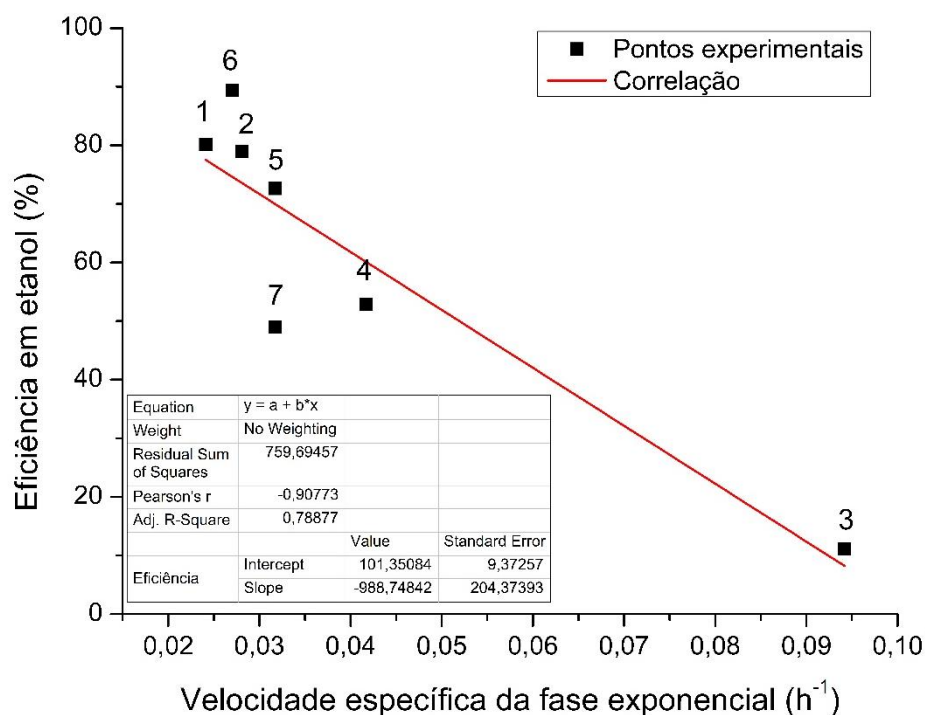
Por meio das Figuras 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 observa-se o decaimento do pH nas primeiras 20 h de fermentação, estabilizando entre 3,25 e 3,0. O mosto apresentou em média o pH igual a 4,5. Esse decaimento está relacionado à produção de ácidos orgânicos como subprodutos da fermentação alcoólica (Fleet, 1994). O aumento da acidez nas primeiras horas de fermentação do mosto de hidromel também já foi relatado em outros trabalhos (Sroka & Tuszyński, 2007), variando de acordo com as cepas utilizadas e a presença de compostos nitrogenados. No trabalho de Mendes-Ferreira *et al.* (2010) diferentes suplementações alteraram o decaimento do pH ao longo da fermentação, entretanto a variação foi muito similar às variações encontradas no presente estudo. Os autores em questão obtiveram valores para o pH entre e 3,27 à 3,67 ao final da fermentação, muito similares aos encontrados nesse trabalho.

#### **5.3.2. Biomassa**

Os crescimentos celulares observados em cada ensaio, por meio das Figuras 26, 31, 36, 41, 46, 51 e 56 demonstram certa falta de uniformidade no crescimento microbiano. Como descrito no trabalho de Pereira *et al.* (2013), cada cepa de levedura responde de forma diferente ao crescimento e à sua concentração inicial. O que pode-se observar é que há uma relação entre as fases do crescimento microbiano e a produção de etanol, glicerol e consumo dos substratos. No ensaio 1, por exemplo, que possui fase lag até 10 horas e fase exponencial até 45 horas, percebe-se rápido consumo de glicose na fase lag, seguida de desaceleração na fase exponencial e comportamento oposto para o etanol, com maior velocidade de produção justamente no período exponencial. Para o glicerol observa-se um acúmulo na fase lag seguido de expulsão ao meio durante a fase exponencial. A mesma situação é observada para os ensaios 2, 4, 5, 6 e 7. Comportamento similar foi observado no trabalho de Pereira *et al.* (2009), e foi utilizado para a seleção de leveduras específicas para a produção de hidromel.

No trabalho de Mileski (2016) foi utilizada levedura de panificação para a produção de hidromel e observou-se maior capacidade de crescimento da mesma em relação aos fermentos de vinhos comerciais Red Star Champagne e Lalvin EC 1118. A mesma apresentou rendimento próximo de 82% e maior quantidade de açúcares residuais, fator similar aos dados presentes nesse trabalho.

Também observou-se nesse trabalho uma correlação de Pearson de -0,9077 para a relação entre a velocidade específica da fase exponencial e o rendimento em etanol para os ensaios obtidos. A correlação está apresentada na Figura 60.



**Figura 60 – Correlação observada entre a velocidade específica da fase exponencial e a eficiência em etanol.**

### 5.3.3. Consumo de glicose, frutose e produção de etanol

O consumo de glicose e frutose, e produção de etanol observados nesse trabalho são compatíveis com os encontrados nos trabalhos de Pereira *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2009). A frutose é consumida de forma mais lenta do que a glicose, sendo esta o carboidrato de preferência das leveduras. Entretanto, devido a este trabalho tratar de uma cepa não propícia para a produção de bebidas, observa-se falta de uniformidade no comportamento fermentativo,

principalmente comparando-se os ensaios 3 e 5. O ensaio 3 apresentou indícios de inibição fermentativa, com indícios de perda de células durante a fase lag (Figura 36) e demora e baixa produção de etanol (Figura 37). Nesse ensaio, a levedura apresentou rápido crescimento após o decaimento da concentração celular, atingindo o maior valor de velocidade específica de crescimento ( $0,09417 \text{ h}^{-1}$ ) com 12,64% de rendimento em etanol. A situação observada indica que o fermento utilizado, possivelmente o lote ou até mesmo o primeiro momento de impacto da levedura com o meio, impossibilitou uma boa fase lag, causando morte celular. As novas células, adaptadas, cresceram rapidamente, porém com deficiência na produção de etanol. Em contrapartida, o ensaio 5 com maior concentração de açúcares apresentou resposta melhor, com consumo e produção similares aos ensaios 1 e 2, atingindo 72,62% de eficiência em etanol.

Comparando-se os ensaios em que foi empregada a realimentação de substrato (mel de abelhas) com os demais experimentos, observou-se que para os ensaios em que não foi utilizada a adição fracionada de nutrientes o rendimento caiu quando houve realimentação (ensaio 7 em comparação com 1 e 2). Contudo, quando empregada a adição fracionada o inverso foi observado, aumentando-se o rendimento (ensaio 6 em relação à 4). Dessa maneira o maior rendimento foi o observado no ensaio 6, em que foram empregadas as duas situações de realimentação, nutrientes e substrato.

#### **5.3.4. Glicerol e Ácido acético**

Como descrito por Hohman & Mager (2003) o glicerol é uma substância utilizada como mecanismo de osmorregulação da parede celular das leveduras, e é acumulado em situações de estresse osmótico e expelido quando a pressão osmótica se equilibra novamente. A maior produção de glicerol foi observada para o ensaio 6, que chega a atingir  $10 \text{ g.L}^{-1}$  com 30 horas de fermentação. Esse comportamento é similar à ensaios realizados leveduras específicas para a produção de hidromel como os trabalhos de Gomes *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2015). Nota-se também que a produção de glicerol está relacionada com o consumo de substratos e a produção de etanol por parte das leveduras. Os ensaios 1, 2, 5 e 6, que por ventura apresentaram maior rendimento, apresentaram concentrações de glicerol entre 3 e  $10 \text{ g.L}^{-1}$  durante o processo fermentativo. Essa situação sugere que as células que conseguiram responder



bem à pressão osmótica causada pelo mel (não só pela concentração de açúcares mas por compostos inibidores) apresentaram maior capacidade de consumo de substrato e produção de etanol. Porém, percebe-se que isso não está relacionado com alguma variável analisada nesse estudo, mas talvez devido à inespecificidade da levedura de panificação em crescer em mostos de hidromel.

As concentrações finais de ácido acético não ultrapassaram  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5 e 7, fato também observado nos trabalhos de Sroka & Tuszynski (2007), que observaram produção e consumo do ácido acético durante a fermentação. Entretanto, o ensaio 6 apresentou concentração de  $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ . As flutuações observadas nos ensaios para a concentração de ácido acético sugerem que sua produção está relacionada também com a mudança de metabolismo da levedura. Como descrito por Hohman & Mager (2003), as leveduras sob condições de limitação de nutrientes tendem a produzir substâncias em que poderão realizar um consumo posterior, evitando uma oxidação completa. Além disso, os mostos não foram submetidos a tratamento térmico ou químico para a sua esterilização. Dessa maneira, o ácido acético pode ser um indicador de atividade bacteriana. Mesmo sob competição com a alta concentração de células de leveduras, algumas bactérias podem ter produzido ácido acético no meio.

### **5.3.5. Amino Nitrogênio Livre (FAN)**

Não foi possível observar variações de nitrogênio assimilável através das análises de amino nitrogênio livre referente à adição de nutrientes fracionada. Nenhum dos ensaios apresentou de forma coerente relação entre nutrição utilizada e concentração de FAN. Entretanto, com exceção do ensaio 1, observou-se que em maiores concentrações de mel de abelhas, houve maior concentração de FAN, como observado nas Figuras 49 e 54, inclusive com aumento observado após a realimentação na Figura 54. O ensaio 5, que apresentou maior concentração de mel, obteve o maior valor para FAN ( $\approx 40$  ppm). Como relatado por diversos autores (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010) (Barbosa *et al.*, 2009), o nitrogênio assimilável exerce grande influência na cinética de fermentação, crescimento microbiano e na produção de aromas. No trabalho de Pereira *et al.* (2015) a suplementação atinge em torno de 300 ppm

de FAN e o experimento controle, sem suplementação atinge em torno de 40 à 50 ppm. Esses resultados, em comparação aos autores citados, sugere que a suplementação utilizada não conferiu nitrogênio suficiente. Dessa maneira, todos os ensaios parecem ser reproduzidos sob limitação de nitrogênio. Entretanto, mesmo sob essa condição há um período de 20 à 40 horas de crescimento exponencial verificado, enquanto há consumo de nitrogênio em alguns ensaios. Esses fatores sugerem que haja alguma outra fonte de nitrogênio não detectável suprindo a demanda das células, e as mesmas estejam iniciando fase estacionária devido à limitação de outros compostos.

### 5.3.6. Quantificação de compostos voláteis

Apenas 3 substâncias foram detectadas na quantificação de compostos voláteis nas amostras: álcool isoamílico, álcool 2-feniletílico e álcool isobutílico. Das 3 substâncias, o álcool 2-feniletílico é responsável pelo aroma de pétalas e mel, e é desejado. As outras duas substâncias são considerados como *off-flavors*. Todos os ensaios apresentaram concentrações detectáveis de álcool isoamílico, com produção em maior concentração nos ensaios 1 e 4 (mais que 1 g.L<sup>-1</sup>). A menor concentração para o álcool isoamílico foi observada para o ensaio 2, que mesmo similar ao ensaio 1 apresentou menor concentração. Entretanto, também observa-se que o ensaio 2 apresentou a menor concentração de FAN, que de acordo com Abbas (2006, p. 285) tem a leucina como precursor. Os valores de FAN dos ensaios 1 e 4 se mostraram maiores que o ensaio 2 (18 à 25 ppm). Entretanto, como citado anteriormente, não pode-se sugerir uma relação entre FAN e os precursores desses álcoois superiores devido a baixa quantidade de nitrogênio assimilável em todos os ensaios. Mendes-Ferreira *et al.* (2010) e Roldán *et al.* (2011) observaram uma relação inversamente proporcional entre a concentração de nitrogênio assimilável e a produção de álcoois superiores no mosto de hidromel. Entretanto, Barbosa *et al.* (2009) obteve resultados inversos aos descritos anteriormente para a produção de vinhos. Porém, concentrações semelhantes foram obtidas por esses autores (120 à 350 ppm).

A produção de álcool 2-feniletílico foi maior para o ensaio 7 e menor para o ensaio 2, sugerindo relação negativa entre a produção da substância e a concentração inicial de mel. Para o álcool isobutílico, o mesmo foi detectado

apenas nos ensaios 1 e 6 e nenhuma correspondência foi encontrada para a produção do mesmo.

## 5. Conclusão

Diante de todo o exposto aqui apresentado pode-se sugerir que determinadas situações contribuíram para não uniformidade do comportamento experimental das leveduras no mosto de hidromel. Os ensaios em batelada de substrato demonstraram sinais de inibição pela levedura com o aumento da concentração de mel, entretanto na concentração mais alta ainda assim, houve atenuação completa. Dessa forma, acredita-se que a levedura em questão não apresentou uniformidade nas características fermentativas de lote para lote. Além disso, reconhece-se que o fermento utilizado estava devidamente adaptado para a produção de bebidas, mas sim para a panificação.

Entretanto, o comportamento cinético apresentado de modo geral está de acordo com outros autores assim como a caracterização do mel de abelhas. As leveduras apresentaram preferência pela glicose em relação à frutose, e produziram quantidades de glicerol e ácido acético em conformidade com ensaios realizados por outros autores. Observou-se também que as técnicas empregadas de batelada alimentada de mel e adição fracionada de nutrientes se mostraram eficientes na fermentação do mosto de hidromel, haja visto que no ensaio 6, tais resultados foram melhor tipificados.

Mais experimentos que avaliem os efeitos da concentração de mel e de nutrientes à base de nitrogênio são necessários para compreender o comportamento das leveduras em ambientes com restrição de substratos e nutrientes e em como o produto final pode ser afetado por esses fatores.

## 6. Referências

IV, O. I. DE LA V. ET DU VIN. Méthodes d'analyse: Analyses physiques. In: **Recueil des méthodes internationaux d'analyse des vins et des moûts**. 2 ed. Paris, France, 2015.

Abbas, C. A. Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In: Querol, A.; Fleet, G. **The Yeast Handbook Volume 2**. New York: Springer, 2006.

Abernathy, D. G.; Spedding, G.; Starcher, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 2, nº 115, pp. 22-127, 2009.

Agazzi, F. M.; Nelson, J.; Tanabe, C. K.; Doyle, C.; Boulton, R. B.; Buscema, F. Aging of Malbec wines from Mendoza and California: Evolution of phenolic and elemental composition. **Food Chemistry**. vol. 269, pp. 103-110, 2018.

Alencar, H. G.; Martínez, E. A.; Amorim, T. S.; Carvalho, G. B. M. TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE HIDROMEL ENRIQUECIDO COM CAJÁ POR VIA FERMENTATIVA. **Anais do XXI Seminário de Iniciação Científica da UEFS**. no. 21, pp. 53-56, 2017.

Alvarez-Suarez J.M.; Giampieri F.; Brenciani, A.; Mazzoni, L.; Gasparri, M.; González-Paramás, A. M.; Santos-Buelga, C.; Morroni, G.; Simoni, S.; Fobes-Hernández, T. Y.; Afrin, S.; Giovanetti, E.; Battino, M. *Apis mellifera* vs *Melipona beechi* Cuban polifloral honeys: A comparison based on their physiochemical parameters, chemical composition and biological properties. **LWT – Food Science Technology**. vol. 87, pp. 272-279, 2018.

Amorim, T. S.; Lopes, S. B.; Bispo, J. A. C.; Bonafe, C. F. S.; Carvalho, G. B. M.; Martínez, E. A. Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. **LWT – Food Science and Technology**. vol. 97, pp. 561-569, 2018.

Anunciação, A. S.; Martínez, E. A.; Amorim, T. S.; Martins, J. A. B.; Souza, S. M. A. PRODUÇÃO DE HIDROMEL COM POLPA DE TAMARINDO (*Tamarindus*

*indica L.*) **Anais do XXI Seminário de Iniciação Científica da UEFS.** no. 21, pp. 53-56, 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis.** 16. Ed. Airlington: AOAC, 1998.

Bahiru, B.; Mehari, T.; Ashenafi, M. Yeast and lactic acid flora of *tej*, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units. **Food Microbiology.** vol. 23, no. 3, pp. 277-282, 2006.

Baiano, A.; Varva, G. Evolution of physico-chemical and sensory characteristics of Minutolo white wines during aging in amphorae: A comparison with stainless steel tanks. **LWT – Food Science and Technology.** vol. 103, pp. 78-87, 2019.

Barbosa, C.; Falco, V.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** vol. 108, no. 2, pp. 99-104, 2009.

Beer Judge Certification Program. **BJCP Mead Exam Study Guide: What you need to know how to pass the Mead Exam.** St. Louis Park, US. Revised 2013-2016 by Steve Piatz, 2016.

Blateyron, L.; Sablayrolles, J. M. Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** vol. 91, no. 2, pp. 184-189, 2001.

Bortolini, F. **Mercado Cervejeiro.** Maringá-PR; Unicesumar, 184 p., 2019.

Brasil. Decreto nº 6871 de 4 de junho de 2009, seção III: Art 48. 2009.

Brasil. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000, 2000.

Bravi, E.; Marconi, O.; Sileoni, V.; Perretti, G. Determination of free fatty acids in beer. **Food Chemistry.** vol, 215, pp. 341-346, 2017.

Czabaj, S.; Kawa-Rygielska, J.; Zucharska, A. Z.; Kliks, J. Effects on mead wort heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. **Molecules**. vol. 22, no. 5, pp. 1-15, 2017.

Da Costa, A. C. V.; Sousa, J. M. B.; da Silva, M. A. A. P.; Garruti, D. S.; Madruga, M. S. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the Brazilian semiarid region. **Food Research International**. vol. 105, pp. 110-120, 2018.

De Moraes, L. F. **O Guia do Hidromel Artesanal**. 1ª ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2018.

Da Silva, P. M.; Gauche, C.; Gonzana, L. V.; Costa, A. C. O.; Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**. vol. 196, pp. 309-323, 2016.

El-Mansi, E. M. T.; Bryce, C. F. A.; Dahhou, B.; Sanchez, S.; Demain, A. L.; Allman, A. R. **Fermentation Microbiology and Biotechnology**. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Taylor & Francis Group, 2011.

EUR-Lex. Access to European Union Law. <eur-lex.europa.eu>. Acessado em 15/04/2019, 2012.

Fairbairn, S.; McKinnon, A.; Musarurwa, H. T.; Ferreira, A. C.; Bauer, F. F. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **Frontiers in Microbiology**. vol. 8, no. Dec., pp. 1-12, 2017.

Fleet, G. H. **Wine microbiology and biotechnology**. Sydney: Harwood Acad. Pub. pp. 166-179, 1994.

Ghanem, C.; Taillandier, P.; Rizk, M.; Rizk, Z.; Nehme, N.; Souchard, J. P.; Rayess, Y. El. Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. **LWT – Food Science and Technology**. vol. 83, pp. 101-109, 2017.

Gomes, T.; Barradas, C.; Dias, T.; Verdial, J.; Morais, J. S.; Ramalhosa, E.; Estevinho, L. M. Optimization of Mead Production Using Response Surface Methodology. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 59, pp. 680-686, 2013.

Gschaedler, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. **Food Science**. vol. 13, no. 17, pp. 73-77, 2017.

Hiss, A. **Cinética de Fermentações**: Uma análise matemática da atividade microbiana. 1ª Ed. São Paulo: Edição do Autor, 2013.

Hohman, S.; Mager, W. H. **Yeast Stress Responses**. New York: Springer, 2003.

Iglesias, A.; Pascoal, A.; Choupina, A. B.; Carvalho, C. A.; Feás, X.; Estevinho, L. M. Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. **Molecules**. vol. 19, no. 8, pp. 12577-12590, 2014.

Kahoun, D.; Rezková, S.; Královský, J. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. **Food Chemistry**. vol. 219, pp. 357-363, 2017.

Kawa-Rygielska, J.; Adamenko, K.; Zucharska, A. Z.; Szatkowska, K. Fruit and herbal meads – Chemical composition and antioxidant proprieties. **Food Chemistry**. vol. 283, pp. 19-27, 2019.

Kowalski, R. L. **Em 17 anos, produção de mel de abelha mais que dobra no Paraná**: Bem Paraná, 2018. Acessado em 20/06/2019. Disponível em: <<https://www.bemparana.com.br/noticia/em-17-anos-producao-de-mel-de-abelha-mais-que-dobra-no-parana#.XQvGoYhKhPY>>

Lallemand Wine. Nutrientes e protetores do vinho. Disponível em: <<https://www.lallemandwine.com/pt-pt/brazil/produtos/catalogue/nutrientes-e-protetores-do-vinho>>. Acesso em: 19 maio 2019.

Liu, G.; Tao, C.; Zhu, B.; Bai, W.; Zhang, L.; Wang, Z.; Liang, X. Identification of *Zygosaccharomyces mellis* strains in stored honey and their stress tolerance. **Food Science and Biotechnology**. vol. 25, no. 6, pp. 1645-1650, 2016.

Liu, S. **Bioprocess Engineering**: Kinetics, Sustainability, and Reactor Design. 2nd Ed. Syracuse: Elsevier, 2016.



Mendes-Ferreira, A.; Cosme, F.; Barbosa, C.; Falco, V.; Inês, A.; Mendes-Faia, A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 144, no. 1, pp. 193-198, 2010.

Mileski, J. P. F. **Produção e Caracterização de Hidromel Utilizando Diferentes Cepas de Leveduras *Saccharomyces***. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil, 2016.

De Moraes, L. F. **O Guia do Hidromel Artesanal**. 1ª Ed: Livraria da Física, 2018.

Moreira, R. F. A.; De Maria, C. A. B.; Pietroluongo, M.; Trugo, L. C. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**. vol. 212, no. 3, pp. 697-704, 2010.

Nascimento, K. S.; Sattler, J. A. G.; Fagundes, L.; Macedo, L.; González, C. V. S.; Melo, I. L. P.; Araújo, E. S.; Granato, D.; Sattler, A.; Almeida-Muradian, L. B. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **LWT – Food Science Technology**. vol. 91, pp. 85-94, 2018.

Nielsen, J.; Villadsen, J.; Lidén, G. **Bioreaction Engineering Principles**. 2<sup>nd</sup> Ed: Springer, 2002.

Olivo, J. E. **Efeito da concentração inicial de microrganismos (*S. cerevisiae*) e da recirculação de células em parâmetros cinéticos de processos simultâneos de sacarificação e fermentação de meios preparados a partir de farinha de raspa de mandioca**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

Pascoal, A.; Anjos, O.; Féas, X.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M. Impact of fining agents on the volatile composition of sparkling mead. **Journal of Institute of Brewing & Distilling**. vol. 125, no. 1, pp. 125-133, 2019.

Pascoal, A.; Oliveira, J. M.; Pereira, A. P.; Féas, X.; Anjos, O.; Estevinho, L. M. Influence of fining agents on the sensorial characteristics and volatile composition of mead. **Journal of Institute of Brewing & Distilling**. vol. 123, no. 4, pp. 562-571, 2017.

Peligrini, A. O crescimento do mercado de hidromel está com tudo! **Old Pony Meadery, 2019**. Disponível em: <<https://www.oldpony.com.br/o-crescimento-do-mercado-de-hidromel-esta-com-tudo>>. Acesso em: 19 maio de 2019.

Pereira, A. P.; Dias, T.; Andrade, J.; Ramalhosa, E.; Estevinho, L. M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 47, pp. 2057-2063, 2009.

Pereira, A. P.; Mendes-Ferreira, A.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M.; Mendes-Faia, A. High-cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food Microbiology**. vol. 33, no. 1, pp. 114-123, 2013.

Pereira, A. P.; Mendes-Ferreira, A.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M.; Mendes-Faia, A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. **LWT – Food Science and Technology**. vol. 56, no. 1, pp. 21-30, 2014.

Pereira, A. P.; Mendes-Ferreira, A.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M.; Mendes-Faia, A. Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. **Institute of Brewing & Distilling**. vol. 121, no. 1, pp. 122-128, 2015.

Piatz, S. **The Complete Guide to Making Mead: The ingredients, equipment, processes, and recipes for crafting honey wine**. Minneapolis, US: Voyageur Press, 2014.

Qureshi, N.; Tamhane, D. V. Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. vol. 27, pp. 27-30, 1987.

Qureshi, N.; Tamhane, D. V. Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. vol. 21, no. 5, pp. 280-281, 1985.

Roldán, A.; van Muiswinkel, C. C. J.; Lasanta, C.; Palacios, V.; Caro, I. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**. vol. 126, pp. 574-582, 2011.

Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia Industrial: Vol. 2 Engenharia Bioquímica**. 1ª Ed: Edgard Blucher, 2001.

Schramm, K. **The Complete Meadmaker: Home production of honey wine from your first batch to award-winning fruit and herb variations**. Colorado, US: Brewers publications, 2003.

Souza, P. L. N.; Dias, F. D.; Teixeira, N. C. Produção Artesanal de Um Hidromel de Acerola Orgânica. **Revista Pensar Gastronomia**. vol. 4, no. 1, 2018.

Sroka, P.; Tuszynski, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**. vol. 104, pp. 1250-1257, 2007.

Sroka, P.; Satora, P. The influence of hydrocolloids on mead wort fermentation. **Food Hydrocolloids**. vol. 63, pp. 233-239, 2017.

Steinkraus, K. H.; Morse, R. A. Factors influencing the fermentation of honey in mead production. **Journal of Apicultural Research**. vol. 5, no. 1, pp. 17-26, 1966.

## Apêndice A – Construção das curvas padrão

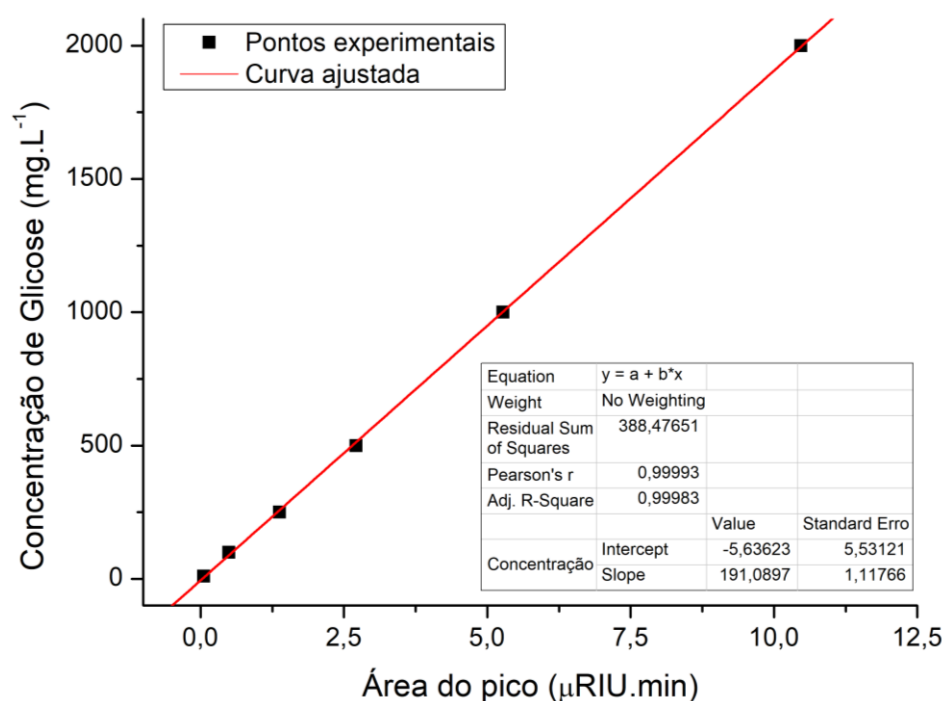
### A1. Curva padrão para a concentração de glicose

Para a obtenção da curva padrão de glicose, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 32.

**Tabela 32 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de glicose.**

Área do pico ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ )	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0,0526	10
0,4929	100
1,3769	250
2,709	500
5,2738	1000
10,4717	2000

Através dos dados da Tabela 32 a curva padrão para a concentração de glicose foi construída e está apresentada na Figura 61.



**Figura 61 - Curva padrão para o cálculo da concentração de glicose.**

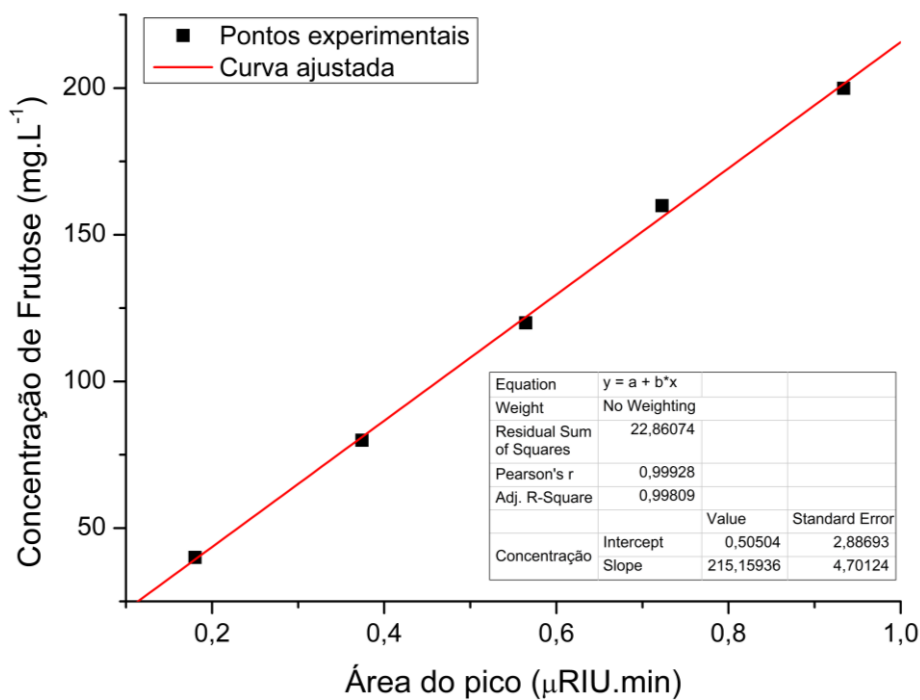
## A2. Curva padrão para a concentração de frutose

Para a obtenção da curva padrão de frutose, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 33.

**Tabela 33 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de frutose.**

Área do pico ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ )	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0,1813	39,98
0,3742	79,96
0,5644	119,94
0,7229	159,92
0,9337	199,9

Através dos dados da Tabela 33 a curva padrão para a concentração de frutose foi construída e está apresentada na Figura 62.



**Figura 62 – Curva padrão para o cálculo da concentração de frutose.**

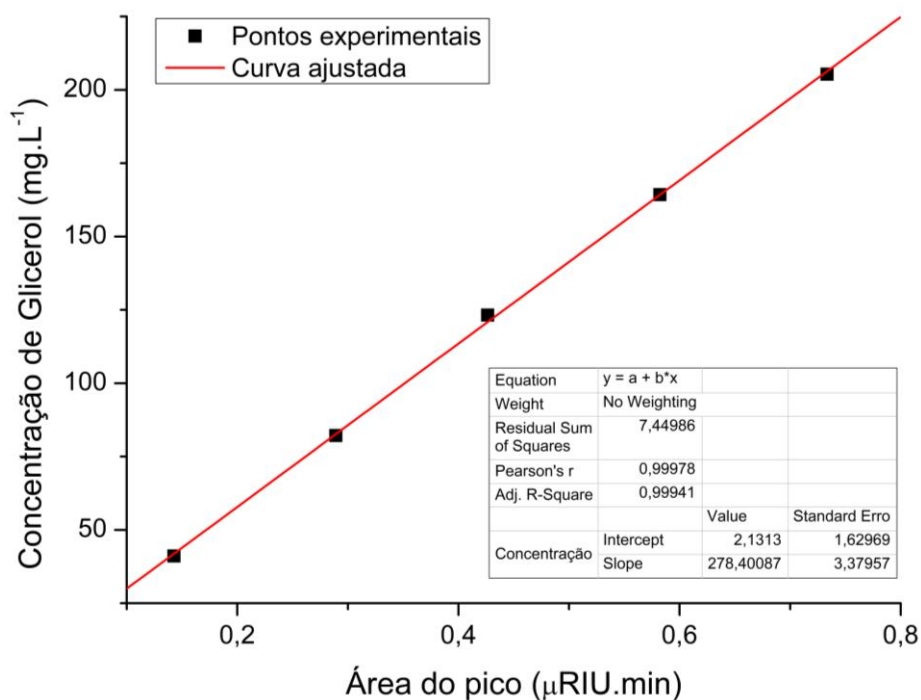
### A3. Curva padrão para a concentração de glicerol

Para a obtenção da curva padrão de glicerol, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 34.

**Tabela 34 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de glicerol**

Área do pico ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ )	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0,1428	41,06
0,2892	82,12
0,4264	123,18
0,5822	164,24
0,7334	205,3

Através dos dados da Tabela 34 a curva padrão para a concentração de glicerol foi construída e está apresentada na Figura 63.



**Figura 63 – Curva padrão para o cálculo da concentração de glicerol.**

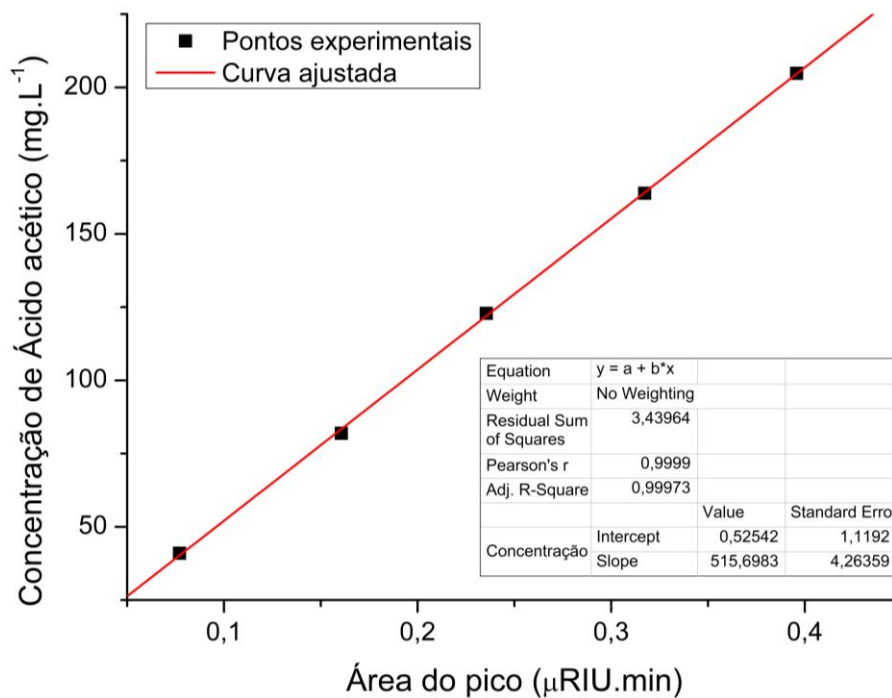
#### A4. Curva padrão para a concentração de ácido acético

Para a obtenção da curva padrão de ácido acético, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 35.

**Tabela 35 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de ácido acético**

Área do pico ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ )	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0,0771	40,96
0,1606	81,92
0,2355	122,88
0,3173	163,84
0,3958	204,8

Através dos dados da Tabela 35 a curva padrão para a concentração de ácido acético foi construída e está apresentada na Figura 64.



**Figura 64 – Curva padrão para o cálculo da concentração de ácido acético.**

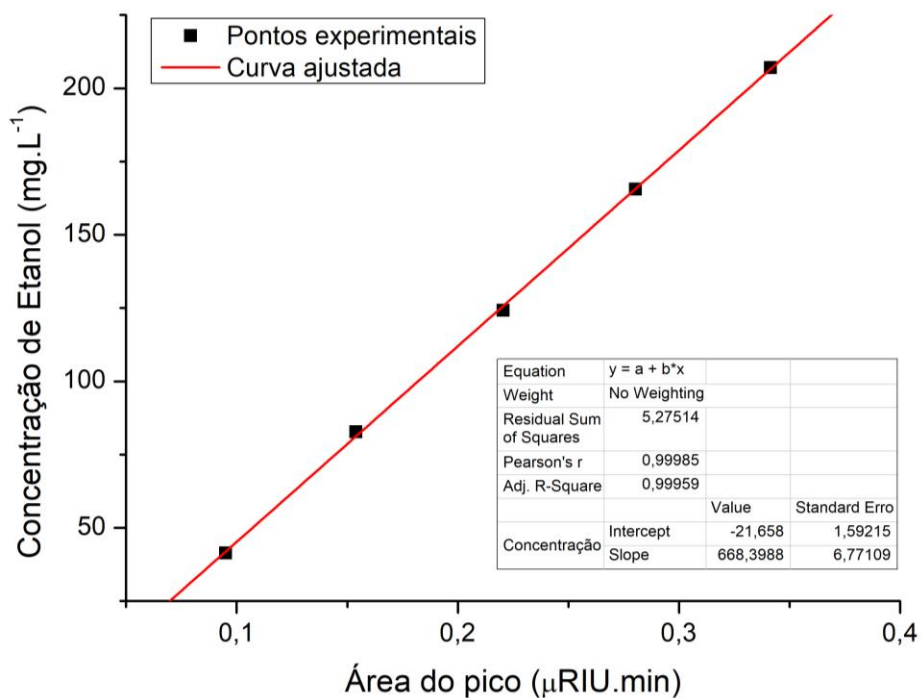
### A5. Curva padrão para a concentração de etanol

Para a obtenção da curva padrão de etanol, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 36.

**Tabela 36 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de etanol**

Área do pico ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ )	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0,095	41,4
0,1539	82,8
0,2205	124,2
0,2803	165,6
0,3414	207

Através dos dados da Tabela 36 a curva padrão para a concentração de etanol foi construída e está apresentada na Figura 65.



**Figura 65 – Curva padrão para o cálculo da concentração de etanol.**



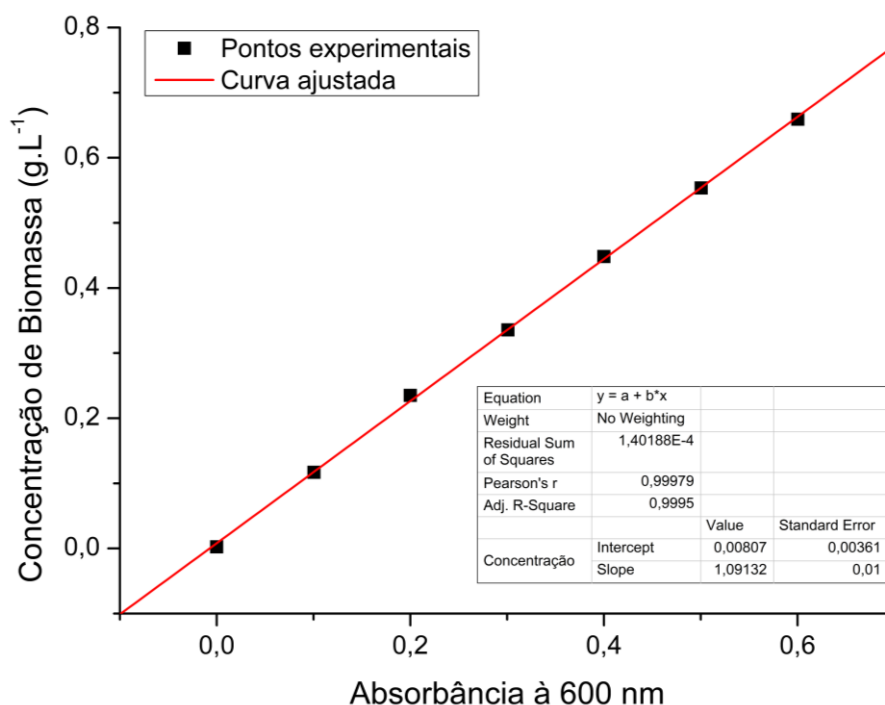
## A6. Curva padrão para a concentração de biomassa

Para a obtenção da curva padrão de biomassa, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 37.

**Tabela 37 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de biomassa**

Absorbância à 600 nm	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
0	0,00237
0,1006	0,1169
0,2	0,23505
0,3008	0,33558
0,4	0,44817
0,5005	0,55353
0,6003	0,65907

Através dos dados da Tabela 37 a curva padrão para a concentração de biomassa foi construída e está apresentada na Figura 66.



**Figura 66 – Curva padrão para o cálculo da concentração de biomassa.**

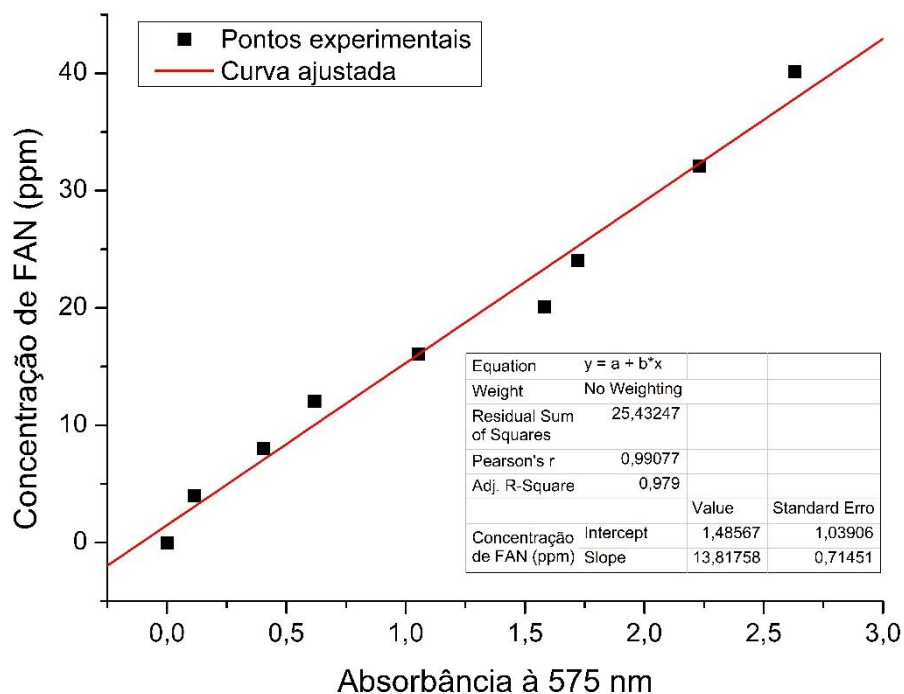
**A7. Curva padrão para a concentração de FAN**

Para a obtenção da curva padrão de FAN, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 38.

**Tabela 38 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de FAN**

<b>Absorbância à 575 nm</b>	<b>Concentração (ppm)</b>
2,631	40,119
2,232	32,0952
1,72	24,0714
1,582	20,0595
1,053	16,0476
0,619	12,0375
0,403	8,0238
0,116	4,0119
0	0

Através dos dados da Tabela 38 a curva padrão para a concentração de FAN foi construída e está apresentada na Figura 67.



**Figura 67 – Curva padrão para o cálculo da concentração de amino nitrogênio livre (FAN).**

#### **A8. Curva padrão para a concentração de álcool isoamílico**

Para a obtenção da curva padrão de álcool isoamílico, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 39.

**Tabela 39 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool isoamílico**

<b>Área do pico</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
219093,4	0,5
52376,8	0,1
2180,8	0,01
2012,6	0,005
1438,6	0,001

Através dos dados da Tabela 39 a curva padrão para a concentração de FAN foi construída e está apresentada na Figura 68.

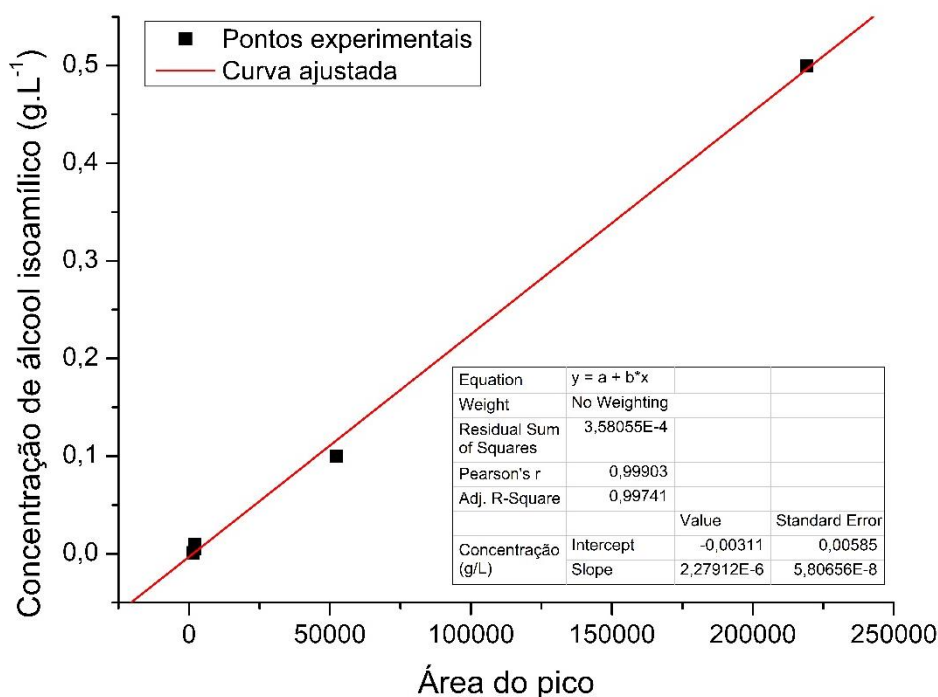


Figura 68 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isoamílico.

#### A9. Curva padrão para a concentração de álcool 2-feniletíl

Para a obtenção da curva padrão de álcool 2-feniletíl, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool 2-feniletíl

Área do pico	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
252744	0,5
53073,3	0,1
4073,6	0,01
1605	0,005
839,9	0,001

Através dos dados da Tabela 40 a curva padrão para a concentração de FAN foi construída e está apresentada na Figura 69.

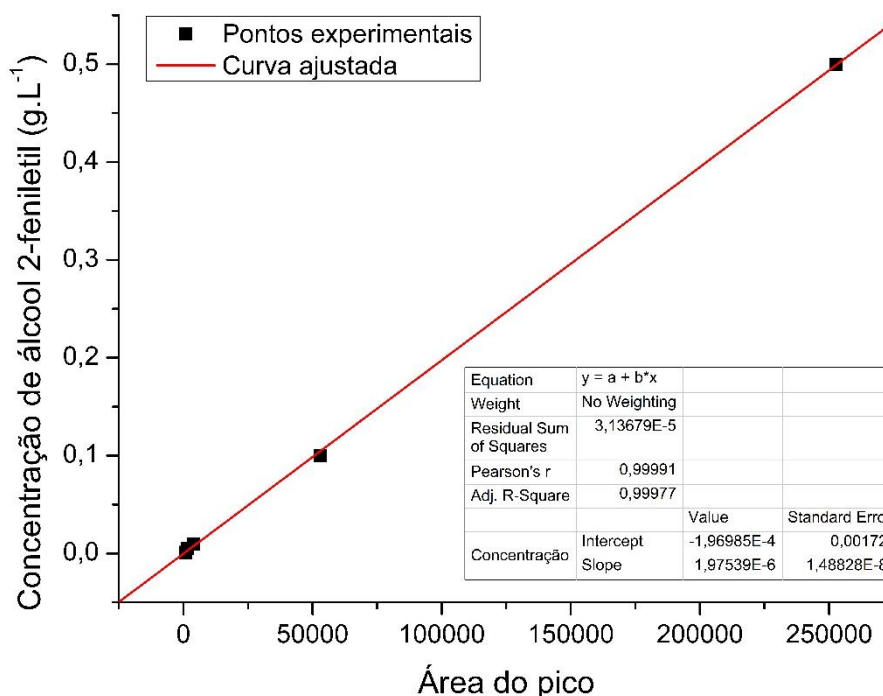


Figura 69 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool 2-feniletílico.

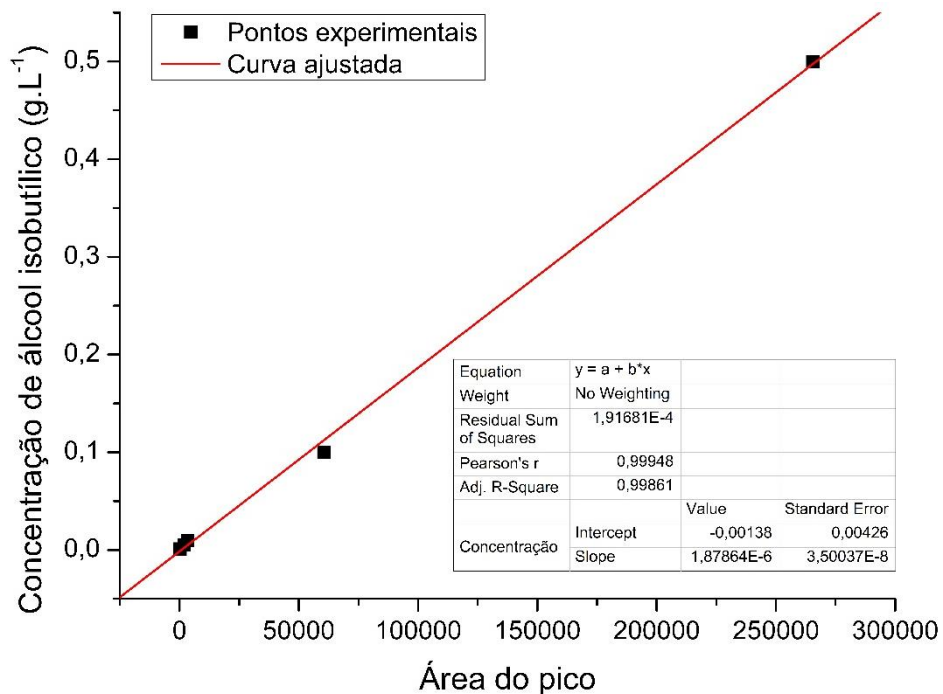
#### A10. Curva padrão para a concentração de álcool isobutílico

Para a obtenção da curva padrão de álcool isobutílico, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 41.

Tabela 41 – Dados utilizados na construção da curva padrão de concentração de álcool isobutílico

Área do pico	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
265452,3	0,5
60460,4	0,1
3385,1	0,01
2001,4	0,005
278,3	0,001

Através dos dados da Tabela 41 a curva padrão para a concentração de FAN foi construída e está apresentada na Figura 70.



**Figura 70 – Curva padrão para o cálculo da concentração de álcool isobutílico.**

## Apêndice B – Dados utilizados na construção dos gráficos dos ensaios

### B1. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 1

Para a construção do gráfico de pH do ensaio 1 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 42

**Tabela 42 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH do ensaio 1**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
6	2,11
18	2,87
24,17	3,24
30,04	3,15
33,54	3,15
45,71	3,14
57,49	3,24
69,87	3,12
81,54	3,13
95,62	3,05
123,12	3,3

Para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 1 estão apresentados na Tabela 43.

**Tabela 43 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 1**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítmo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	6,61	1,88
12	12,37	2,52
24,17	16,69	2,81
30,04	18,48	2,91
33,54	21,23	3,06
57,49	26,80	3,29
81,54	25,69	3,25
123,12	23,97	3,18

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 1, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 44.

**Tabela 44 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 1**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	64,44507	0	85,10884	0	0
12	32,24933	6	69,26526	6	0
18	23,41867	12	64,83166	12	2,32345
24,17	11,66375	24,17	47,87968	18	12,04562
30,04	7,00232	30,04	45,72808	24,17	20,14743
33,54	4,88875	45,71	27,62939	30,04	23,99579
45,71	1,88043	57,49	19,73457	33,54	26,73016
57,49	0	69,87	10,32535	45,71	37,66074
69,87	0	81,54	1,28852	57,49	47,24983
81,54	0	95,62	0,44442	81,54	59,28117
95,62	0	123,12	0,81682	123,12	65,37397
123,12	0	-	-	-	-



Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético do ensaio 1 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 45.

**Tabela 45 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de concentração de glicerol e ácido acético para o ensaio 1**

Tempo (h)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )
0	3,22727	0	0,80303
6	7,15017	6	0,9593
12	6,81272	18	1,97507
18	8,37345	24,17	1,50626
24,17	7,44545	33,54	1,19371
45,71	6,11961	45,71	0,44187
57,49	6,86916	57,49	0,4022
69,87	7,97206	69,87	0,38236
95,62	6,39802	81,54	0,38236
123,12	7,56517	95,62	0,32286
-	-	123,12	0,67989

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 1 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 46.

**Tabela 46 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 1**

Tempo (h)	FAN (ppm)
18	25,5493
33,54	21,60563
57,49	20,47887
95,62	16,39437

## **B2. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 2**

Para a construção do gráfico de pH do ensaio 2 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 47.

**Tabela 47 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH para o ensaio 2.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,47
4,1	3,81
8,28	3,61
12,43	3,57
16,48	3,53
19,06	3,47
30,86	3,41
33,19	3,4
44,17	3,41
55,94	3,4
70,97	3,43
80,12	3,41

Para a construção do gráfico de biomassa para o ensaio 2 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 48.

**Tabela 48 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa para o ensaio 2.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítimo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	7,10144	1,9603
8,28	12,28635	2,50849
12,43	12,51991	2,52732
19,06	16,39773	2,79714
30,86	15,21072	2,722
44,17	16,39773	2,79714
55,94	15,80423	2,76028
70,97	20,14366	3,00289
80,12	19,00905	2,94491

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 2, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 49.

**Tabela 49 – Dados experimentais de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 2.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	65,30145	0	81,2956	0	0
4,1	58,01615	4,1	77,77236	4,1	0
12,43	45,9297	19,06	64,37865	12,43	5,09175
16,48	39,57596	33,19	53,97028	16,48	7,6818
30,86	17,72004	44,17	39,97543	30,86	26,8983
33,19	9,57483	55,94	30,81768	44,17	43,23472
44,17	3,93945	70,97	16,7247	55,94	43,19295
55,94	0	80,12	11,3726	70,97	49,4592
70,97	0			80,12	54,34687
80,12	0				

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético do ensaio 2 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 50.

**Tabela 50 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 2.**

Tempo (h)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )
0	3,5325	0	1,50376
4,1	4,0197	4,1	1,37434
12,43	6,2469	12,43	0,98606
16,48	6,7689	16,48	1,37434
19,06	7,2909	19,06	1,63319
30,86	8,8569	30,86	1,43905
55,94	6,86445	33,19	0,85664
70,97	6,79485	44,17	0,42832
80,12	6,96885	55,94	0,88131
-	-	70,97	0,55774
-	-	80,12	0,42832

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 2 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 51.

**Tabela 51 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 2**

Tempo (h)	FAN (ppm)
12,43	14,28169
19,06	14,42254
23,98	14
33,19	14

### **B3. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 3**

Para a construção do gráfico de pH do ensaio 3 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 52.

**Tabela 52 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH para o ensaio 3.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,58
3,98	4,16
7,98	3,75
11,98	3,6
15,98	3,73
19,93	3,52
22,93	3,65
28,93	3,59
35,5	3,58
47,73	3,45
59,56	3,48
83,94	3,43

Para a construção do gráfico de biomassa para o ensaio 3 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 53.

**Tabela 53 – Dados utilizados para a construção do gráfico de biomassa para o ensaio 3.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítmo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	6,46092	1,86577
3,98	3,92884	1,36834
7,98	3,51544	1,25716
11,98	4,75564	1,55933
19,93	12,84944	2,5533
22,93	12,51136	2,52664
35,5	15,20476	2,72161
47,73	17,89421	2,88448
59,56	18,01115	2,89099
83,94	20,98411	3,04377

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 3 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 54.

**Tabela 54 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 3.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
7,98	68,1678	7,98	70,24176	0	0
11,98	52,61785	28,93	61,31262	3,98	0
15,98	43,4933	35,5	55,42262	7,98	0
19,93	42,41842	47,73	46,12094	11,98	0
22,93	31,93236	59,56	36,72113	15,98	0
28,93	29,2571	83,94	29,60741	19,93	0
35,5	20,77748	-	-	22,93	0
47,73	14,06722	-	-	28,93	0,6636
59,56	7,28353	-	-	35,5	0
83,94	0	-	-	47,73	4,13333
-	-	-	-	59,56	10,48312
-	-	-	-	83,94	10,73378

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 3 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 55.

**Tabela 55 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 3.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicerol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ácido acético (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	3,3933	2,01621
3,98	3,0453	1,56498
7,98	4,0197	1,1782
11,98	4,2285	1,56498
15,98	4,3329	1,30713
19,93	4,4025	1,24266
22,93	4,6809	1,56498
28,93	5,3421	2,40299
35,5	4,5765	0,98481
47,73	3,21045	0,91141
59,56	3,99345	1,13703
83,94	4,11525	0,42794

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 3 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 56.

**Tabela 56 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 3**

<b>Tempo (h)</b>	<b>FAN (ppm)</b>
11,98	36,95775
22,93	15,12676
35,5	14,56338
83,94	14,42254

#### **B4. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 4**

Para a construção do gráfico de pH para o ensaio 4 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 57.



**Tabela 57 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 4.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,33
4	4,07
8	3,92
12	3,42
16	3,31
20	3,17
26	3,34
32	3,44
37	3,24
48,5	3,16
59,5	3,32
71,75	3,19
83,75	3,26
96,37	3,21

Para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 4 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 58.

**Tabela 58 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 4**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítimo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	5,11737	1,63264
4	5,58244	1,71963
8	9,92315	2,29487
12	11,21503	2,41725
20	16,23021	2,78687
32	17,32896	2,85238
37	18,12808	2,89746
48,5	17,30955	2,85126
59,5	19,41434	2,96601
71,75	20,1646	3,00393
83,75	17,0505	2,83618
96,37	16,5588	2,80692

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 4 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 59.

**Tabela 59 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 4.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
8	62,29178	8	94,77	0	0
12	56,75017	12	91,65018	4	0
16	41,46297	16	84,41542	8	0
26	25,41141	26	77,36893	12	0
32	21,25521	37	65,88876	16	0
37	13,17149	48,5	49,05249	26	13,6974
48,5	1,58666	59,5	33,17099	32	27,65025
59,5	0	71,75	14,49241	37	37,34445
71,75	0	83,75	2,4838	48,5	41,35485
83,75	0	96,37	1,1256	59,5	41,39663
96,37	0	-	-	71,75	49,6263
-	-	-	-	83,75	46,57673
-	-	-	-	96,37	46,4514

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético do ensaio 4 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 60.

**Tabela 60 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 4.**

Tempo (h)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )
0	2,8713	0	0,79143
4	3,3933	4	1,6939
8	4,2633	8	0,98481
12	5,0985	16	2,01621
16	6,3861	20	0,92035
20	8,2305	26	2,27406
26	8,0565	32	2,98315
37	8,25645	37	0,94364
48,5	8,86545	48,5	1,23373
59,5	8,65665	59,5	1,00811
71,75	8,98725	71,75	1,16926
83,75	8,46525	83,75	1,65273
96,37	7,97805	96,37	0,78249

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 4 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 61.

**Tabela 61 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 4.**

Tempo (h)	FAN (ppm)
12	17,52113
26	16,25352
37	17,09859
71,75	17,09859

#### **B5. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 5**

Para a construção do gráfico de pH do ensaio 5 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 62.

**Tabela 62 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 5.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,47
4	3,85
8,03	3,73
12,03	3,41
16,03	3,45
20,03	3,39
24,03	3,38
30,03	3,34
35,03	3,44
47,03	3,33
59,03	3,38
71,03	3,3
82,75	3,37
95,37	3,38
119,97	3,4

Para a construção do gráfico biomassa do ensaio 5 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 63.

**Tabela 63 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa do ensaio 5**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítimo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	11,67909	2,4578
8,03	14,51838	2,67542
20,03	21,9105	3,08697
24,03	23,81618	3,17037
35,03	25,95326	3,2563
47,03	28,19211	3,33904
59,03	28,60916	3,35373
82,75	26,6364	3,28228
95,37	25,93185	3,25547
119,97	24,1	3,18221

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 5 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 64.

**Tabela 64 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 5**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	135,742	0	157,27398	0	0
8,03	85,41367	12,03	135,00492	4	0
12,03	76,28913	20,03	109,93878	12,03	17,2065
16,03	47,41065	24,03	106,41554	16,03	19,713
20,03	44,20989	35,03	82,45608	20,03	34,4178
24,03	35,20478	47,03	70,2592	24,03	42,52215
30,03	18,34286	59,03	53,34224	35,03	59,61053
35,03	17,11272	71,03	39,62579	47,03	70,80622
47,03	6,23253	82,75	23,82498	59,03	79,8714
59,03	0	95,37	14,18312	71,03	94,95217
71,03	0	119,97	2,86033	82,75	90,52402
82,75	0	-	-	95,37	102,30458
95,37	0	-	-	119,97	107,31758
119,97	0	-	-	-	-

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 5 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 65.

**Tabela 65 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 5**

Tempo (h)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )
0	3,2193	0	0,6625
4	5,4117	8,03	1,30963
8,03	6,5253	12,03	1,76261
12,03	8,0913	20,03	3,18629
20,03	9,7965	30,03	0,46068
24,03	10,0053	35,03	0,46068
35,03	9,42225	47,03	0,42832
47,03	10,10085	59,03	1,07544
59,03	10,67505	71,03	0,33125
71,03	11,17965	82,75	1,39901
82,75	10,53585	95,37	0,78424
95,37	11,92785	119,97	0,78424
119,97	11,21445		

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 5, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 66.

**Tabela 66 – Dados experimentais para a construção do gráfico de FAN do ensaio 5.**

Tempo (h)	FAN (ppm)
12,03	30,19718
20,03	30,33803
30,03	39,6338
59,03	34,42254

#### **B6. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 6**

Para a construção do gráfico de pH para o ensaio 6, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 67.



**Tabela 67 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de pH do ensaio 6.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,68
4	3,92
8	3,74
12	3,38
16	3,53
20	3,42
24	3,33
30,03	3,36
36,03	3,49
48,03	3,36
60,03	3,54
72,03	3,51
83,86	3,49
96,08	3,25

Para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 6 fora utilizados os dados apresentados na Tabela 68.

**Tabela 68 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 6.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítimo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	9,42977	2,24387
4	10,40512	2,3423
8	12,40227	2,51788
12	14,30653	2,66072
20	16,36138	2,79492
24	19,15072	2,95234
30,03	23,05841	3,13803
36,03	23,85341	3,17193
48,03	23,39912	3,1527
60,03	23,39912	3,1527
72,03	27,18167	3,30254
83,86	22,44857	3,11123
96,08	22,14321	3,09753

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 6 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 69.

**Tabela 69 – Dados experimentais utilizados para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol do ensaio 6**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	48,1989	0	75,56697	0	0
4	36,70961	4	73,17332	4	0
8	30,33198	20	53,05586	8	8,8515
12	21,75682	30,03	45,71352	12	11,8593
16	13,39663	36,03	29,04261	16	21,96885
20	1,35796	48,03	8,36036	24	29,98965
24	0	60,03	23,73085	30,03	38,9295
30,03	0	72,03	12,85182	36,03	48,03885
36,03	0	83,86	1,83832	48,03	52,09103
48,03	0	96,08	0,65494	60,03	66,29452
60,03	0	-	-	72,03	68,25795
72,03	0	-	-	83,86	71,47463
83,86	0	-	-	96,08	71,6835
96,08	0	-	-	-	-

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético do ensaio 6 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 70.

**Tabela 70 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 6.**

Tempo (h)	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )
0	2,8365	0	2,08067
4	3,7761	4	2,01621
8	4,3329	8	1,04928
12	6,9429	12	0,98481
16	8,6133	16	0,85589
24	9,6573	20	2,01621
30,03	10,0053	24	2,2096
60,03	9,54405	36,03	1,36265
72,03	8,03025	48,03	0,75026
83,86	8,39565	60,03	0,97588
96,08	8,63925	72,03	0,81472
-	-	83,86	0,46018
-	-	96,08	1,29819

Para a construção do gráfico de FAN para o ensaio 6, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 71.

**Tabela 71 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de FAN para o ensaio 6**

Tempo (h)	FAN (ppm)
12	17,38028
24	14
36,03	14,28169
72,03	16,11268

#### **B7. Dados utilizados na construção dos gráficos do ensaio 7**

Para a construção do gráfico de pH do ensaio 7 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 72.

**Tabela 72 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de pH para o ensaio 7**

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>
0	4,58
8,13	3,64
12,13	3,52
16,13	3,47
22,26	3,38
28,26	3,29
33,26	3,3
46,26	3,28
57,26	3,35
69,88	3,35
94,46	3,26
104,96	3,28
120	3,28

Para a construção do gráfico de biomassa do ensaio 7 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 73.

**Tabela 73 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de biomassa para o ensaio 7**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Concentração de Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Logarítimo natural da concentração de biomassa (lnX)</b>
0	8,42964	2,13175
12,13	18,80276	2,934
22,26	25,93633	3,25564
57,26	36,95277	3,60964
69,88	36,83547	3,60646
94,46	37,77693	3,6317
104,96	36,76968	3,60467
120	39,62356	3,67942

Para a construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol foram utilizados os dados apresentados na Tabela 74.

**Tabela 74 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de consumo de glicose e frutose e produção de etanol para o ensaio 7**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	41,98714	0	54,27186	0	0
8,13	31,37736	12,13	44,17854	8,13	0
12,13	23,86012	16,13	39,64464	12,13	0
16,13	13,34549	22,26	35,32664	16,13	0,2186
22,26	8,01681	46,26	20,21364	22,26	0
28,26	5,89961	57,26	26,51522	28,26	1,02011
33,26	3,97272	94,46	11,57764	33,26	6,04779
46,26	0,23789	104,96	5,81581	46,26	17,19614
57,26	1,86742	120	2,26695	57,26	26,74145
69,88	1,12997	-	-	104,96	27,6887
94,46	0,49956	-	-	120	26,96005
104,96	0,34494	-	-	-	-
120	0,08326	-	-	-	-

Para a construção do gráfico de glicerol e ácido acético do ensaio 7 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 75.

**Tabela 75 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de glicerol e ácido acético para o ensaio 7.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicerol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Ácido acético (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	2,6625	0	1,43605
12,13	3,5673	8,13	1,6939
16,13	4,1241	16,13	0,85589
22,26	4,1589	22,26	1,37159
28,26	4,8201	28,26	1,75836
33,26	5,0985	33,26	2,27406
46,26	4,6809	46,26	2,53191
57,26	4,28925	57,26	0,42794
69,88	4,53285	69,88	0,94364
94,46	4,04565	94,46	0,36348
104,96	3,69765	104,96	1,00811
120	3,55845	120	0,5891

Para a construção do gráfico de FAN do ensaio 7 foram utilizados os dados apresentados na Tabela 76.

**Tabela 76 – Dados experimentais utilizados na construção do gráfico de FAN para o ensaio 7.**

<b>Tempo (h)</b>	<b>FAN (ppm)</b>
12,13	15,26761
28,26	14,56338
46,26	14,70423
94,46	15,5493