

NIEMES; João Paulo ¹, DALBERTO; Gabriela ², ROSA; Marcos Roberto da ³

RESUMO

Resumo: O presente estudo verificou a influência de diferentes condições de fermentação (tempo, temperatura e cepa) no preparo de hidromel de abelha sem ferrão. O teor de fenólicos totais foi preservado e foi ainda observado o aumento de atividade antioxidante nos fermentados em relação as matérias primas, podendo este fenômeno estar atrelado ao aumento da concentração de DDMP (3,5-dihidroxi-6-metil-2,3-dihidropiran-4-one). Os valores de acidez total dos fermentados sofreram aumentos, o que está relacionado ao metabolismo da levedura, que por meio da formação e liberação de ácido acético causa este comportamento. Os valores de teor alcoólico obtidos situaram-se na faixa de 10,2 a 11,7°GL, sendo estes valores para as temperaturas de 28°C, compreendendo a estes as maiores eficiências fermentativas. Nas condições não ideais, ou seja, utilizando uma cepa de alta fermentação em temperatura de 10°C, a eficiência de fermentação foi baixa, variando de 34,01 a 48,32% (4,0 a 5,8°GL), mostrando que a levedura sofreu desaceleração da via anaeróbica por meio do stress osmótico. A amostra preparada com levedura de baixa fermentação, temperatura de 10°C e tempo de 21 dias se apresentou como uma exceção, com teor alcoólico de 5,7°GL. Este baixo rendimento pode estar relacionado a processos inibitórios causados pela composição do mel de melípona Jataí, sendo a deficiência de zinco um dos possíveis responsáveis por este comportamento.

Introdução

Bebidas fermentadas com propriedades nutricionais são parte de um mercado em expansão, que tem por objetivo atender a uma demanda cada vez maior de consumidores preocupados com o estilo de vida saudável e ansiosos por novidades. Estes fatos têm despertado o interesse dos pesquisadores e de indústrias de alimentos para o desenvolvimento e otimização da produção de novas bebidas funcionais fermentadas, como é o caso do hidromel (GOMES et al., 2013; KAHOUN; ŘEZKOVÁ; KRÁLOVSKÝ, 2017; MARIA et al., 2013; MARSH et al., 2014). No entanto, os processos tecnológicos de produção dessas novas bebidas fermentadas precisam ser otimizados e a realização de caracterizações químicas e sensoriais do produto final são essenciais para oferecer ao consumidor uma bebida com atributos funcionais, características organolépticas aceitáveis e que seja seguro para consumo (MARSH et al., 2014).

O hidromel é uma bebida fermentada obtida pela fermentação do mosto formado pela diluição do mel em água, possuindo teor alcoólico na faixa de 8,0 a 18,0% (v/v) de etanol (IGLESIAS et al., 2014; ROLDÁN et al., 2011). Recentemente, na literatura, pesquisas mostram uma preocupação com a otimização dos processos fermentativos para se obter hidroméis com propriedades sensoriais aprimoradas, empregando menores tempos de fermentação com menores percentuais de contaminantes (KAHOUN; ŘEZKOVÁ; KRÁLOVSKÝ, 2017; ROLDÁN et al., 2011).

Sua produção é tradicionalmente realizada utilizando mel de abelhas do gênero *Apis mellífera*, porém o emprego de mel de abelhas nativas pode elevar suas características sensoriais, visto que essas variedades de mel são amplamente aceitas pelos consumidores, e são caracterizados por seu sabor levemente ácido, menor teor de carboidratos, textura fluída e suas diversas propriedades funcionais,

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joaopauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

contribuindo para uma bebida fermentada de sabores equilibrados e aromas pronunciados (AFONSO, 2012; ALVES et al., 2011). Além disso, a utilização desta variedade de mel pode contribuir para a preservação das espécies de abelhas nativas, bem como da biodiversidade de diversas plantas por meio da polinização promovida pelas abelhas (DOS SANTOS, 2014).

Desta maneira, neste trabalho foi realizado um estudo a respeito da atividade antioxidante, teor de fenólicos e caracterização físico-química de hidromel produzido a partir de mel de abelhas nativas melípona Jataí, avaliando-se a influência na variação dos parâmetros de fermentação tempo, temperatura e tipo de levedura.

Materiais e métodos

Amostras de Mel e Levedura

A amostra de mel de abelhas sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula*, popularmente conhecida como Jataí foi coletada no município de Prudentópolis, Brasil. Duas amostras de levedura foram utilizadas para realização dos experimentos, uma de baixa fermentação (*Saccharomyces carlsbergensis*, Diamond 3070 liofilizada, importada pela Cooperativa Agrária Agroindustrial) e outra de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*, KOSHER GMO FREE, Munich Lallemund, liofilizada).

Preparação dos fermentados

O preparo do mosto para os diferentes tipos de matérias primas foi realizado por meio de diluição em água mineral, obtendo-se soluções de concentração de carboidratos totais numa faixa de 20,0 a 24,0°Bx. Após esta etapa a levedura hidratada foi adicionada ao mosto para iniciar as fermentações. Para isso, foram utilizadas duas cepas de levedura, sendo uma de alta e outra de baixa fermentação, as quais foram combinadas com duas temperaturas (10 e 28°C) e tempos (4 e 21 dias), apresentando assim condições ideais e não ideais para cada tipo de cepa. As amostras preparadas foram nomeadas com a seguinte ordem: como primeira letra indicando a matéria prima, a segunda o tipo de levedura, os algarismos a temperatura de fermentação e a última letra ao tempo utilizado no processo fermentativo.

Ao final do processo fermentativo a bebida foi mantida sob refrigeração numa temperatura de aproximadamente 2°C por sete dias, seguido de uma primeira trasfega. As amostras foram mantidas por mais sete dias nas condições anteriormente mencionadas (em caso de novo depósito ao fundo do recipiente, procedeu-se de segunda trasfega). Após as trasfegas, os fermentados passaram por um processo de maturação durante 20 dias em refrigeradores em temperatura entre 0 e 2°C.

As amostras são compostas por quatro diferentes formulações de hidromel, preparadas em triplicata, totalizando doze amostras. A composição de cada bebida preparada é apresentada na Tabela 1.

Análises físico-químicas

As amostras de mel foram analisadas em triplicata para verificação dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez total (método 174/IV) e teor de água (método 171/IV). Os parâmetros para mostos e hidroméis foram avaliados pelos métodos de pH (método 168/IV), acidez total (método 221/IV) e teor de álcool (método 217/IV). Todos os testes foram realizados de acordo com Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joapauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

Determinação do teor de fenólicos totais

Os teores de fenólicos totais presentes nas matérias primas e seus fermentados foram determinados através de espectrofotometria no UV-Vis utilizando o reagente Follin-Ciocalteu. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque de ácido gálico em etanol na concentração de 1000 mg L⁻¹. Para a quantificação foram construídas curvas analíticas em faixas de concentração diferentes do padrão analítico, apresentando ajuste ao modelo linear. Para a análise quantitativa a curva analítica foi construída em 10 níveis de concentração de ácido gálico (40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 e 400 mg L⁻¹) (KOLC, 2014). A reação entre o reagente Follin-Ciocalteu e os compostos de natureza fenólica foi realizada em balão volumétrico de 5 mL por adição de 100 µL de cada solução padrão, 500 µL de solução tampão de carbonato/tartarato (20 g de Na₂CO₃ e 1,2 g de KNaC₄H₄O₆.4H₂O em 100 mL de água) e 500 µL do reagente Follin-Ciocalteu, nesta ordem. O volume do balão foi ajustado com água ultrapura. Para análise dos fermentados e matérias primas foram realizadas as diluições pertinentes para as leituras segundo a curva analítica traçada. Após o repouso da mistura por 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 760 nm (KOLC, 2014).

Determinação do perfil de atividade antioxidante

Materiais

Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), fenazina metilssulfato (PMS), cloreto de tetrazólio nitroazul (NBT), reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), meio RPMI-1640, ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS) e ágar saboraud dextrose foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco); Leitora de Microplacas (Spectra Max190), Micro centrífuga refrigerada – CT 15000R (Cientec), pHmetro pH 221 (Lutron), balança analítica (Tecnol), Estufa (Quimis), Homogeneizador AP 22 (Phoenix), agitador magnético mini com resistência (Quimis), câmara de fluxo laminar (Veco), estufa bacteriológica (Quimis) e purificador de água MiliQ.

Atividade dos mostos e fermentados sobre o HOCl

a) Preparo do HOCl:

A solução de HOCl 1 mmol L⁻¹ foi preparada a partir de uma solução de NaOCl em NaOH 50 mmol L⁻¹. A concentração da solução de HOCl foi verificada espectrofotometricamente usando o coeficiente de extinção molar 350 cm⁻¹ M⁻¹ em 292 nm.

b) Preparo do TMB:

A solução de TMB 0,014 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,017g de TMB em 2,5 mL de dimetilformamida, 2,45 mL de ácido acético 0,8 mol L⁻¹ e 0,05 mL de KI 0,01 mol L⁻¹.

c) Análise experimental:

Para a análise de poder antioxidante das amostras sobre o HOCl foi utilizado o método de Camargo, (CAMARGO, 2011). A reação ocorreu em PBS 50 mmol L⁻¹, pH 7,4 contendo diferentes concentrações dos mostos e fermentados e 75 µmol L⁻¹ de HOCl, com incubação de 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. O HOCl remanescente foi revelado pela adição de uma solução de TMB (0,014 mol L⁻¹), cujo produto de oxidação possui absorbância máxima em 652 nm.

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joapauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

Foi determinada a atividade antioxidante das amostras sobre ABTS utilizando o método de Carvalho (2011). Inicialmente uma mistura aquosa de ABTS (7 mmol L^{-1}) e persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol L}^{-1}$) foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 12 horas. A solução formada de ABTS foi diluída em PBS 50 mmol L^{-1} , pH 7,4 a uma absorbância de 0,70 (734 nm).

Diferentes concentrações dos mostos e fermentados foram então incubadas com o ABTS por 30 minutos a temperatura ambiente, e a redução do ABTS pelos mostos e fermentados foram observadas em 734 nm.

Resultados e Discussão

Após a realização das fermentações observou-se de forma geral redução do pH e aumento da acidez nos fermentados, sendo os maiores valores de acidez observados utilizando a levedura de baixa fermentação na temperatura de 28°C (Tabela 2). Estes valores foram classificados como significativamente diferentes de suas matérias primas pela análise de variância de um fator (ANOVA de um fator). Os dados de pH para hidroméis descritos na Tabela 2 encontram-se na mesma faixa descrita por Mendes-Ferreira et al., (2010) e Roldán, Muiswinkel, Lasanta, Palacios, & Caro, (2011), sendo observados nestes estudos os valores de pH de 3,27 a 3,67 e 2,95 a 4,05 respectivamente.

Em termos de acidez total se observa os maiores valores para as temperaturas de fermentação de 28°C comparativamente as de 10°C . A temperatura mais elevada atrelada a alta concentração de carboidratos presente nos mostos promove o stress osmótico da levedura, levando a diminuição da velocidade de redução de acetaldeído a etanol, propiciando este aumento de acidez pela formação de ácido acético resultante da oxidação do acetaldeído (SROKA; TUSZYNSKI, 2007). Para as fermentações utilizando a cepa de baixa na temperatura de 28°C , se observam os maiores valores de acidez, contudo não se observa abaixamento significativo de pH se comparado a cepa de alta na mesma condição, isto ocorre pela formação dos sais dos ácidos málico, tartárico, acético e pirúvico, os quais atuam como tampões mantendo o pH na faixa adequada para a fermentação (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

Outro parâmetro que apresentou variação de acordo com o tipo de fermentação foi o grau alcoólico, sendo observado o maior valor para as temperaturas de 28°C , de $10,0^\circ\text{GL}$, compreendendo a estes as maiores eficiências fermentativas, de 81,56% (Tabela 2). As leveduras de baixa fermentação quando submetidas a temperatura de 28°C apresentaram a maior eficiência (96,99%), isto pode ser explicado pela aceleração do metabolismo da cepa, pois esta tem sua temperatura ideal de trabalho na faixa de 7 a 15°C . Nas condições não ideais, ou seja, utilizando uma cepa de alta fermentação em temperaturas 10°C , a eficiência de fermentação foi baixa, 36,89% ($4,5^\circ\text{GL}$) (Tabela 2), mostrando que a levedura sofreu desaceleração da via anaeróbica por meio do stress osmótico (MENDES-FERREIRA et al., 2010). Os valores observados e descritos na Tabela 2 para teor de álcool encontram-se de acordo com a portaria 64 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece os valores de teor de álcool para hidroméis entre 4 e 14% v/v (MAPA, 2008). Estes encontram-se ainda na mesma faixa descrita nos estudos de (2011), que reportam valores para teores de álcool de 10,7 a $11,4^\circ\text{GL}$ e 9,04 a $12,39^\circ\text{GL}$, respectivamente.

Como exceção a este comportamento está a amostra B10L, que apresentou valor de $5,7 \pm 0,6^\circ\text{GL}$. Este baixo rendimento pode estar relacionado a processos inibitórios causados pela composição do mel de melípona Jataí, sendo a deficiência

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joapauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

de zinco um dos possíveis responsáveis por este comportamento (UDEH; KGATLA; JIDEANI, 2014). Porém, como a acidez desta amostra ficou em $20,7 \pm 1,5 \text{ mEq L}^{-1}$, se viabiliza a produção de uma bebida de menor graduação alcoólica, que atende aos consumidores que apreciam este tipo de bebida mais suave e de menor teor alcoólico.

Comparando-se os dados para teor de fenólicos totais do mel de Jataí contidos na Tabela 3 com a literatura, se observa valores similares aos reportados por Silva et al. (2013). Destaca-se que a composição do mel é dependente da espécie da abelha, da flora, grau de maturação e cuidados durante o processamento.

Por meio da Tabela 3 é possível observar que os teores de fenólicos totais dos fermentados não apresentaram variações significativas em relação aos mostos, segundo os resultados da ANOVA de um fator. Esta redução, segundo Bobis, Dezmiorean, & Erler, (2012), é explicada por processos de polimerização e complexação com proteínas, podendo apresentar decréscimos de até 38% no teor de fenólicos (BOBIS; DEZMIREAN; ERLER, 2012). Para o mel, Alvarez-Suarez et al., (2010) e Özcan, Arslan, & Ali Ceylan, (2006) reportam concentrações de proteínas que variam de 0,001 a 0,01%. Conclui-se que a permanência dos fenólicos nos méis é esperada, pois as reações de complexação tem menor tendência de ocorrer.

Nos méis, mostos e hidroméis não se observa variação no teor de fenólicos (ANOVA de um fator), contudo foi observado nos hidroméis aumento da atividade antioxidante sobre os radicais ABTS e HOCl. Segundo os estudos de Bobis, Dezmiorean & Erler, (2012) é difícil traçar uma correlação direta entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante, com isso surge a necessidade de estudos de perfil cromatográfico, onde se pode observar que o processo fermentativo gera modificações nos compostos presentes nos méis.

Considerações Finais

O aumento da atividade antioxidante dos fermentados tornam os hidroméis interessantes ao consumo controlado, assim como os vinhos de uva, pois auxilia na manutenção da saúde. Este comportamento foi evidenciado pela preservação dos compostos antioxidantes da matéria prima, sendo este um dos diferenciais dos processos aplicados, pois em nenhum momento as amostras passaram por aquecimento superior a 40°C, o que causaria a perda dos compostos fenólicos.

O baixo teor alcoólico e acidez obtidas para o hidromel de Jataí viabilizam a produção de uma bebida suave e delicada, agradando os paladares mais exigentes. Com isso, para que se tenha o preparo de um hidromel de melípona, se faz necessária a utilização da levedura de baixa fermentação em sua faixa de temperatura adequada.

Referências

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 8–9, p. 2490–2499, 2010.

ALVES, T.T.L.; MENEZES, A.R.V.; SILVA, J.N.; PARENTE, G.D.L.; NETO, J.P.H. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro; *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.6, n.3, p.91 - 97, 2011.

BOBIS, O.; DEZMIREAN, D. S.; ERLER, S. Botanical Origin Causes Changes in Nutritional Profile and Antioxidant Activity of Fermented Products Obtained from

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joapauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

Honey. 2012.

CAMARGO, L. E. A. Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção. p. 53, 2011.

DOS SANTOS, E. O. Produção de hidromel a partir de mel elaborado pelas abelhas jataí (*tetragonisca angustula*) do município de Rio Bonito do Iguaçu – PR. Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do Sul, p. 56, 2014.

GOMES, T. et al. Optimization of mead production using Response Surface Methodology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 680–686, 2013.

IGLESIAS, A. et al. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12577–12590, 2014.

KAHOUN, D.; ŘEZKOVÁ, S.; KRÁLOVSKÝ, J. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. *Food Chemistry*, v. 219, p. 357–363, 2017.

KOLC, C. S. M. Composição Química De Própolis Amarela Do Mato Grosso Do Sul: Comparação Com Os Tipos De Própolis Verde, Vermelha E Marrom. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, 2014.

MAPA. Instrução Normativa n 64, de 23 de abril de 2008. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2008.

MARIA, T. et al. Journal of Food Composition and Analysis Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and (*Melipona subnitida*) honey antioxidant activity of jandai. v. 29, p. 10–18, 2013.

MARSH, A. J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, v. 38, n. 2, p. 113–124, 2014.

MENDES-FERREIRA, A. et al. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, n. 1, p. 193–198, 2010.

OZCAN, M.; ARSLAN, D.; ALI CEYLAN, D. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. *Food Chemistry*, v. 99, n. 1, p. 24–29, 2006.

ROLDÁN, A. et al. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, v. 126, n. 2, p. 574–582, 2011.

SROKA, P.; SATORA, P. The influence of hydrocolloids on mead wort fermentation. *Food Hydrocolloids*, v. 63, p. 233–239, 2017.

UDEH, H. O.; KGATLA, T. E. Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. v. 4, n. September, p. 19–35, 2013.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Açúcares e produtos correlatos. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*, p. 321–343, 2008.

ÁREA DE PESQUISA: Química orgânica

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, joapauloniemes@gmail.com

² Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, dalbertogabi@gmail.com

³ Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO, mrrmarco@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: abelhas nativas, bebida alcoólica, fermentação, mel, melípona Jataí