

Reutilização de Células Imobilizadas na Produção de Hidromel

Ângela Rafaela Pereira da Fonseca

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

Orientado por
Doutora Joaquina Teresa Gaudêncio Dias
Mestre Ana Paula Rodrigues Pereira

**Bragança
2013**

Dedicatória

Aos meus pais, porque a eles devo tudo o que sou hoje, apoiaram-me sempre em tudo,
os meus sinceros agradecimentos pela confiança e força que depositaram em mim.

Dedico

Agradecimentos

Os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornassem possível:

À Doutora Teresa Dias pela orientação deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos. Agradecer a dedicação, o incentivo, a disponibilidade e a ajuda ao longo da realização do trabalho.

À Ana Paula pela simpatia, dedicação, apoio profissional e pelos conhecimentos transmitidos durante todas as fases deste trabalho.

À Professora Doutora Letícia Estevinho, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela ajuda ao longo do trabalho, pela compreensão e disponibilidade. Também pelo apoio e incentivo.

Ao Doutor João Verdial Andrade, pela disponibilidade, pela ajuda e incentivo, pelos conhecimentos enriquecedores e pela experiência partilhada.

A todos os professores do Mestrado, e ao do Doutor José Alberto Pereira, pelo incentivo e apoio ao longo do Curso.

A todos que trabalharam no laboratório de Microbiologia e Biologia, D^a Arminda, D^a Fátima, D^a Isabel e D^a Amélia e aos que vão passando, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

À Manuela pelo apoio no tratamento dos dados experimentais, paciência e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos especialmente Joana, Sara, Sandra, Joana Viegas e Daniela, agradeço estarem presentes nos bons e nos maus momentos, os conselhos, o incentivo e apoio. Obrigado pelos bons momentos passados, que ajudaram a superar o trabalho e ficarão guardados na memória.

À minha família, ao Zé Carlos e à família dele, pelo apoio incondicional e incentivo.

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

Índice

Resumo	V
Abstarct.....	VII
CAPÍTULO 1: Introdução	1
Introdução geral.....	2
Objetivo geral:	2
Objetivos específicos:.....	2
Enquadramento.....	3
1 Revisão bibliográfica.....	4
1.1 Mel.....	4
1.1.1 Composição e propriedades físico-químicas	4
1.2 Hidromel	8
1.2.1 Condições da fermentação.....	9
1.2.2 Problemas associados à produção de hidromel	11
1.3 Imobilização.....	12
CAPÍTULO 2: Material e Métodos	18
2 Material e Métodos.....	19
2.1 Caracterização Físico-química e Polínica do mel.....	19
2.1.1 Humidade	19
2.1.2 Condutividade elétrica.....	19
2.1.3 Cinzas totais.....	20
2.1.4 pH.....	22
2.1.5 Acidez.....	22
2.1.6 Hidroximetilfurfural (HMF).....	23
2.1.7 Índice Diastásico.....	23
2.1.8 Açúcares Redutores	24
2.1.9 Sacarose aparente	25
2.1.10 Análises Polínicas.....	25
2.2 Produção de hidromel	26
2.2.1 Preparação do mosto-mel	26
2.2.2 Hidratação e imobilização da levedura.....	26
2.2.3 Condições e monitorização da fermentação	27
2.2.4 Caracterização físico-química do mosto-mel e hidromel	28

2.2.5	Caraterização das esferas de alginato no final da fermentação	32
2.2.6	Tratamento estatístico.....	32
CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão.....		34
3	Efeito da reutilização das células imobilizadas em alginato na produção de hidromel.....	35
3.1	Caracterização físico-química e polínica do mel	35
3.2	Produção de hidromel utilizando células imobilizadas em esferas de alginato.....	40
3.2.1	Performance da fermentação durante as diferentes reutilizações de células imobilizadas.....	43
3.2.2	Caracterização físico-química do produto final.....	48
CAPÍTULO 4: Conclusão		52
4	Conclusão	53
CAPÍTULO 5: Referências Bibliográficas.....		55
5	Referências bibliográficas	56
CAPÍTULO 6: Anexos		66
6	Anexos.....	67
6.1	Anexo I: Reagentes utilizadas para a caracterização físico-química e polínica do mel	67
6.2	Anexo II: Reagentes utilizadas para a produção de hidromel.....	70

Índice de Figuras

Figura 1: Diferentes imobilizações celulares de microrganismos. (Fonte: Pilkington <i>et al.</i> (1998)).	14
Figura 2: Formação das esferas (Covizzi <i>et al.</i> , 2007)	15
Figura 3: Condutivímetro (Inolab Cond Lvel 2.)	20
Figura 4: Tabela para a determinação da percentagem de cinzas totais (fonte: Sancho <i>et al.</i> , 1991).	21
Figura 5: Medidor de pH (Meter Basic 20)	22
Figura 6: Procedimento de imobilização das células de levedura em 2% de alginato.	27
Figura 7: Determinação da acidez total.	29
Figura 8: Aparelho de Cazenave-Ferré.	31
Figura 9: Ebuliómetro.	32
Figura 10: Mel de cor escura usado na experiencia.	38
Figura 11: Esquema das fermentações sucessivas.	41
Figura 12: Esferas de alginato a 2% e 4% com <i>S. cerevisiae</i> imobilizada A- início do processo de imobilização B- Após 5 reutilizações.	42
Figura 13: Variação da viabilidade das células <i>S. cerevisiae</i> livres em função do tempo. A - fermentações com 2% de alginato. B- fermentações com 4% de alginato.	45
Figura 14: Variação dos açúcares redutores ao longo do tempo. A - fermentações com 2% de alginato. B- fermentações com 4% de alginato.	47

Índice de Tabelas

Tabela 1: Perfil polínico do mel escuro.....	36
Tabela 2: Análises físico-químicas realizadas ao mel.....	36
Tabela 3: Análise físico-química ao mosto-mel.....	43
Tabela 4: Taxa específica de crescimento, biomassa final das células livres e rendimento em etanol para as diferentes fermentações.	46
Tabela 5: Análises físico-químicas do hidromel	51

Resumo

O hidromel é uma bebida alcoólica, obtida por fermentação do mel, que contém 8 a 18% (v/v) de etanol. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da utilização de células imobilizadas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio e conseqüentemente da sua reutilização na produção de hidromel, usando mel de segunda categoria.

As células foram imobilizadas em duas concentrações diferentes de alginato (2% e 4%) e utilizadas em cinco fermentações sucessivas. Paralelamente realizou-se uma fermentação com células livres, como controle. Todas as fermentações foram monitorizadas diariamente através da leitura da densidade ótica, determinação das unidades formadoras de colónias (UFC's) e determinação dos açúcares redutores. No final das fermentações, a qualidade do hidromel foi avaliada através da determinação de vários parâmetros enológicos nomeadamente: pH, acidez volátil, azoto assimilável, SO₂ total, teor alcoólico e açúcares redutores.

Constatou-se que o mel de segunda categoria utilizado neste trabalho, cumpre todos os requisitos de qualidade descritos no Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de Setembro.

As duas concentrações de alginato (2% e 4%) utilizadas para imobilizar as células de *S. cerevisiae* não afetaram nenhum dos parâmetros estudados. Porém as esferas com 4% de alginato foram mecanicamente mais estáveis, podendo permitir um maior número de reutilizações tornando o processo mais económico.

Nas fermentações conduzidas com células imobilizadas em esferas de alginato tanto a 2% como a 4% a velocidade de consumo de substrato foi superior relativamente ao processo realizado com células livres, reduzindo o tempo de fermentação 24h ou 48h.

A imobilização de células não influenciou de forma significativa alguns dos parâmetros enológicos estudados nomeadamente o açúcar/etanol, o teor alcoólico, o pH e a acidez total. Na produção de ácido acético observou-se um ligeiro aumento (0,70 a 1,08 g/L), mas mantendo valores abaixo do limite legal (1,2 g/L) para o vinho branco. Por outro lado assistiu-se a uma diminuição da produção de SO₂.

No caso das fermentações com células imobilizadas, verificou-se a libertação de células para o mosto, devido à desintegração das esferas durante as várias fermentações,

indicando que a matriz utilizada para a imobilização não é a mais adequada para a fermentação do hidromel.

Palavras-chave: hidromel; imobilização das leveduras; alginato de cálcio

Abstarct

Mead is an alcoholic beverage produced by the fermentation of honey, which contains 8 to 18% (v/v) of ethanol. This work aimed to study the effect of the use of immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate and hence its reuse in the production of mead using honey second category.

The cells were immobilized in alginate two different concentrations (2% and 4%) and used in five successive fermentations. In parallel there was a cell-free fermentation as a control. All fermentations were monitored daily by reading the optical density determination of colony forming units (CFU's) and determination of reducing sugars. At the end of fermentation, the quality of the mead was assessed by determining various enological parameters such as: pH, volatile acidity, assimilable nitrogen, total SO₂, alcohol and sugars.

It was found that the second category of honey used in this work, meets all quality requirements described in Decree - Law No. 214/2003 of 18 September.

The two alginate concentrations (2% and 4%) used to immobilize cells of *S. cerevisiae* does not affect any of the parameters studied. However balls with 4 % alginate were mechanically more stable and can allow a greater number of reuses making the process more economical.

In fermentations conducted with cells immobilized in alginate balls as much as 2% to 4% of the speed of substrate consumption was higher for the process carried out with cell-free reducing fermentation time 24h or 48h.

Immobilization of cells not significantly influenced some of oenological parameters studied including yield, alcohol content, pH and total acidity. In the production of acetic acid there was a slight increase (0.70 to 1.08 g/L) , while maintaining below the legal limit values (1.2 g/L) to white wine. On the other hand there has been a decrease in the production of SO₂.

In the case of fermentations with immobilized cells, there was the release of cells into the wort due to the disintegration of the balls during various fermentations, indicating that the matrix used for immobilization is not the most suitable for the fermentation of mead.

Keywords: mead; immobilization of yeast, calcium alginate

CAPÍTULO 1: Introdução



Introdução geral

Trás-os-Montes tem todas as condições para produzir mel de boa qualidade, no entanto de forma a aumentar o rendimento dos apicultores é necessário transformar o mel não escoado, ou mel de segunda categoria, num produto apropriado e valorizado pelos consumidores como o hidromel.

O sector apícola tem sido uma mais-valia na economia desta comunidade rural. No entanto os apicultores não têm acesso ao mercado.

Em Portugal o hidromel é uma bebida alcoólica, produzida de uma forma empírica e artesanal, apresentando vários problemas e vários custos associados à sua produção.

Nos últimos anos, os sistemas de imobilização de células tem vindo a ser explorados para a produção de bebidas alcoólicas.

A imobilização reduz os custos de funcionamento, permite o controlo dos processos de fermentação e aumenta a qualidade do produto final.

Objetivo geral:

Avaliar o número de vezes que as células de levedura imobilizadas podem ser utilizadas na produção de hidromel sem que a "performance" fermentativa seja afetada.

Objetivos específicos:

- Avaliar a possibilidade de utilizar mel de segunda categoria na produção de hidromel.
- Avaliar o efeito da concentração de alginato (2% e 4%) utilizadas na imobilização de células de *S. cerevisiae* na produção de hidromel.
- Avaliar o número de vezes que as células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato podem ser reutilizadas sem que a performance fermentativa seja afetada.

Enquadramento

No primeiro capítulo apresenta-se uma breve introdução ao tema e a revisão bibliográfica como os problemas das células imobilizadas e as suas vantagens e desvantagens. No segundo capítulo procede-se à descrição das metodologias utilizadas para a realização do trabalho experimental. No terceiro capítulo apresentam-se os resultados e a discussão dos mesmos, recorrendo à comparação com trabalhos realizados por outros investigadores. Finalmente, no quarto capítulo apresentam-se as principais conclusões que se podem retirar do trabalho efetuado, tendo em conta os objetivos propostos.

1 Revisão bibliográfica

1.1 Mel

Segundo o Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de Setembro “*Mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia.*”

Segundo este Decreto-Lei, o mel pode ter diversas origens: mel de néctar ou mel de flores, e mel de melada. O tipo e o modo de produção ou apresentação também pode variar em favos, mel com pedaços de favos, escorrido, centrifugado, prensado e filtrado.

O mel é conhecido como um bom conservante, devido ao seu elevado teor em açúcares (Cherbuliez e Domerego, 2003), mas também pela sua composição nutricional, demonstrando benefícios para a saúde, como efeitos diurético, digestivo, prevenção de gripes e constipações, entre outros (Cuevas-Glory *et al.*, 2007).

1.1.1 Composição e propriedades físico-químicas

Embora o mel se caracterize por ser uma mistura com uma elevada concentração de açúcares, apresenta uma composição complexa, tendo sido identificados até ao momento cerca de 200 compostos (Al-Mamary *et al.*, 2002; Arráez-Román *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007). É principalmente constituído por frutose e glucose (85% a 95%), (Finola *et al.*, 2007). Apresenta, no entanto, outras substâncias secundárias, tais como, sais minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos, enzimas, e outros fitoquímicos (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

A composição físico-química do mel é, contudo, muito variável uma vez que depende não só da sua origem floral como também dos fatores sazonais e ambientais, condições de processamento, armazenamento e maturação (Silva *et al.*, 2004).

A variação das propriedades físico-químicas do mel resulta no aparecimento de méis com diferentes características, podendo-se encontrar no mercado méis com diferentes tonalidades.

A cor do mel pode variar desde amarelo pálido até âmbar vermelho escuro, quase preto (Bertoncelj *et al.*, 2007). A cor do mel está relacionado com o conteúdo em minerais e compostos fenólicos e de certa forma esta característica é utilizada para determinar a origem botânica do mel (Bertoncelj *et al.*, 2007; Baltrušaitytė *et al.*, 2007). Convém, no entanto, salientar que a idade e as condições de armazenamento do produto também influenciam a cor, enquanto a quantidade de partículas suspensas influencia a transparência ou a claridade (Olaitan *et al.*, 2007).

A consistência do mel expressa-se pela viscosidade, característica com grande importância comercial, uma vez que os consumidores associam o mel puro a um produto de viscosidade elevada. O mel pode apresentar-se fluido, viscoso, parcialmente ou totalmente cristalizado. A composição do mel, a temperatura e principalmente o teor em água influenciam a consistência do mel (Abu-Jdayil *et al.*, 2002).

O aroma, gosto, cor, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionados com a fonte de néctar que o originou. Quanto à origem do néctar, este pode provir de uma única flor (mel monofloral ou unifloral) ou de várias (mel multifloral). A obtenção de méis monoflorais depende das características climáticas da região, e das técnicas adotadas pelo apicultor, neste tipo de mel a presença de outro néctar em pequena quantidade não influencia o seu aroma, cor e sabor. Normalmente, se um mel apresenta uma qualidade de grãos de um tipo de pólen maior ou igual a 45%, considera-se como monofloaral dessa espécie botânica. Porém esta regra simples, apresenta algumas exceções, como é o caso do mel de castanheiro. Neste mel o pólen de castanheiro surge sobre representado e apenas os méis que possuem no mínimo 70% do pólen *Castanea* poderão ser considerados como monoflorais (Maia *et al.*, 2005). Por outro lado, o pólen de lavandula (15%) aparece sub-representado. Assim na avaliação das espécies vegetais que realmente contribuem para a formação do mel, deve-se considerar a presença de pólen de plantas nectaríferas que fornecem muito néctar, mas pouco pólen (sub-representadas) e plantas prolíferas, produzem pouco néctar, mas muito pólen (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia *et al.*, 2003).

A análise polínica do mel fornece indicações sobre a origem botânica, geográfica, época de colheita e, inclusive permite detetar adulterações.

Cada tipo de mel possui características físico-químicas relacionadas com a origem botânica como a cor, acidez, pH, conteúdo de minerais, condutividade elétrica e relação frutose/glicose. Estes parâmetros em conjunto com a humidade e quantificação de hidroximetilfurfurool são utilizados como indicadores de qualidade do mel.

A Legislação Portuguesa determina que o mel deve apresentar um teor mínimo de 60g/100g de açúcares redutores, glucose e frutose. A proporção de frutose e glucose depende da fonte do néctar (Anklam, 1998), mas normalmente é de 1,2/1 (de Rodríguez *et al.*, 2004). Esta relação pode influenciar o *flavour* do mel, visto que a frutose é mais doce e a glucose é menos solúvel na água. Assim, os méis com relações de frutose superior à glucose permanecem líquidos durante um maior período de tempo (de Rodríguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007).

A presença de mais de 5% de sacarose aparente no mel pode significar tanto uma recolha prematura (Küçük *et al.*, 2007), como indicar adulteração do produto (Sodré *et al.*, 2007).

A água é o segundo componente mais importante no mel, o seu conteúdo depende de vários fatores como a época de colheita, grau de maturação, fatores climáticos (Finola *et al.*, 2007).

O mel é um alimento higroscópico, pois capta água facilmente (Vargas, 2006). Segundo o Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro o limite máximo de água no mel é de 20%, visto que o excesso pode apresentar dificuldades na preservação e armazenamento (Olaitan *et al.*, 2007). O conteúdo de água é um fator de extrema importância, pois influencia a viscosidade, peso, maturidade, cristalização, conservação, sabor e palatabilidade do mel (Mendes *et al.*, 2009), prevenindo a fermentação e a granulação durante o armazenamento (Küçük *et al.*, 2007).

O mel é constituído por 0,57% de ácidos orgânicos, sendo constituído essencialmente pelo ácido glucónico, um produto resultante da digestão enzimática da glucose (Olaitan *et al.*, 2007). Neste produto também estão presentes ácidos como pirúvico, málico, cítrico, succínico e fumárico. Estes ácidos orgânicos são responsáveis pela acidez e pelo sabor característico do mel (Anklam, 1998).

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

O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1, sendo a média de 3,9 (Iurlina e Fritz,2005), este parâmetro não está diretamente relacionado com a acidez livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (de Rodríguez *et al.*, 2004).

Os minerais embora presentes em pequenas quantidades, influenciam a cor do mel. Quanto mais rico em minerais, mais escuro vai ser o mel, Nos méis claros encontram-se descritos valores de 0,04% e de 0,2% em alguns méis escuros (Anklam,1998), este indicam a origem geográfica do mel e a sua poluição ambiental (Anklam, 1998).

O teor em cinzas está diretamente relacionada com o teor em minerais do mel. Consequentemente o mel de cor clara, apresenta um teor de cinzas mais baixo que os méis de cor escura (Finola *et al.*, 2007).

O mel é constituído por aproximadamente 0,2% de teor em proteína (Anklam,1998; Iurlina e Fritz, 2005), sendo que uma pequena percentagem pertence a enzimas como invertase, diastase, amilase, oxidase de glucose, catalase (Anklam, 1998), α -glucosidase e β -glucosidade (Won *et al.*, 2008). Estas enzimas são próprias das abelhas e das plantas.

O conteúdo em azoto do mel é muito baixo, sendo o valor médio de 0,04% (Anklam, 1998). Estes compostos são normalmente alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas (Al-Mamary *et al.*, 2002). Relativamente aos aminoácidos associados, a prolina é dominante na sua constituição, mas também se pode encontrar arginina, triptofano e cisteína (Anklam, 1998). O perfil de aminoácidos é adequado para detetar a origem botânica e geográfica do mel (Anklam, 1998).

O índice diastásico e o teor em HMF são parâmetros indicadores da frescura do mel (Valbuena, 1992; de Rodríguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007). O índice diastásico diminui com o tempo de armazenamento, ou abuso da temperatura (Vargas, 2006; Fallico *et al.*, 2006). A diástase é um grupo de enzimas (α e β –amilases), segregadas pela abelha que hidrolisam o amido, originando dextrinas e maltose, respetivamente. Esta enzima é sensível ao calor. Assim a determinação do índice diastásico tem sido utilizado para avaliar sobreaquecimento durante o processamento do mel (Vargas, 2006), como adulterações do produto (Aroucha et al.,2008). O HMF é um composto formado pela degradação dos açúcares, diminuindo desta forma o valor nutritivo do produto. A presença do HMF influencia diretamente a cor, sabores e odores estranhos, sendo por isso utilizado como um parâmetro da qualidade do mel (Valbuena, 1992). O HMF forma-se por desidratação das hexoses em condições ácidas e a sua

cinética de formação varia diretamente com a temperatura. O mel, normalmente, tem na sua constituição pequenas concentrações de HMF, no entanto, concentrações mais elevadas indicam sobreaquecimento, armazenamento prolongado e adulteração (Vargas, 2006). Os limites estabelecidos para estes dois parâmetros são um mínimo de 8, para o índice diastásico e um máximo de 40 mg/kg, para o HMF.

Os compostos voláteis são responsáveis pelo sabor (Finola *et al.*, 2007). Muitos destes compostos são provenientes do néctar das flores e já foram identificados mais de 300 compostos (Castro-Vazquez *et al.*, 2009). Estes compostos são indicadores da origem botânica, se foi produzido pelas abelhas através do néctar das flores ou se foi pela secreção das plantas ou insetos (Escriche *et al.*, 2009).

A qualidade do mel também é influenciada pela quantidade de microrganismos presentes no mel. A carga microbiana no mel é influenciada pelo tipo de mel e pelo seu teor de água, visto que, o baixo teor em água inibe o crescimento. Os fungos são mais tolerantes que as bactérias ao elevado efeito osmótico (Olaitan *et al.*, 2007). No entanto, a ação bacteriostática ou bactericida, o pH baixo e o elevado teor em açúcares redutores que o mel apresenta, consegue prevenir o crescimento de muitos microrganismos (Iurlina e Fritz, 2005).

1.2 Hidromel

A Apicultura Portuguesa contribui de forma significativa para o desenvolvimento socioeconómico das comunidades rurais, além de contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes. Inclusive, nos últimos anos verificou-se um aumento do número de colmeias, apiários e apicultores, elevando a capacidade produtiva anual para 12000 toneladas de mel, o equivalente a uma faturação de 31 milhões de euros. As razões por detrás desta vitalidade do sector são diversas, começando pela valorização atual do mercado internacional, pela organização do próprio sector e na valorização qualitativa dos produtos da apicultura. Apesar da Apicultura se apresentar favorável nos cenários mundial e nacional e o mercado de Trás-os-Montes apresentar perspectivas de crescimento, os apicultores deparam-se com limitações estruturais aliadas às dificuldades de acesso ao mercado e de escoar todo o produto, principalmente o mel que não detém a Denominação de origem Protegida.

Assim, uma forma de aumentar o rendimento dos apicultores seria a transformação do mel não escoado num produto apreciado e valorizado pelos consumidores.

O hidromel é uma bebida alcoólica tradicional, que contém entre 8 a 18% (v/v) de etanol, que resulta da fermentação das leveduras do mel diluído (Sroka e Tuszynski, 2007).

O hidromel é uma das mais antigas bebidas consumidas pelo homem, sendo o seu uso generalizado, mas com a evolução da civilização e da agricultura houve uma substituição do hidromel por outras bebidas, como o caso do vinho. Quando as condições não são favoráveis para a produção de vinho, como é o caso do norte da Europa, o hidromel continua a ser muito apreciado e consumido, passando o consumo do vinho para segundo plano, tendo como consequência, o vinho ser importado a baixos custos (Sroka e Tuszynski, 2007).

Hoje em dia, o hidromel é consumido em alguns países como Inglaterra, Polónia, Alemanha, Eslovénia e principalmente países Africanos como o caso da Etiópia e África do Sul. Em Portugal, o hidromel, é produzido de uma forma artesanal, pois a sua produção está associada a inúmeros problemas (Sroka e Tuszynski, 2007).

A capacidade do hidromel fermentar depende fundamentalmente da variedade de mel, da estirpe da levedura, a composição do meio de cultura e o controlo do pH (Navrátil *et al.*, 2001)

Segundo Pereira *et al.* (2013), a estirpe de levedura mais adequada é ICV D47, visto que apresenta uma alta taxa de fermentação, uma baixa produção de acetaldeído e acidez volátil, também é a estirpe recomendada para a produção de hidromel.

1.2.1 Condições da fermentação

A fermentação do mel pode durar algum tempo, isto porque o mel apresenta uma elevada concentração de açúcares, propicia ao aparecimento de “amuos” da fermentação o que faz com que a fermentação seja demasiado demorada. A variedade do mel, a estirpe da levedura, o pH, a quantidade de nutrientes presentes, influenciam a fermentação (Navrátil *et al.*, 2001).

O hidromel é produzido em vários passos, primeiro começa-se por diluir o mel em água ou sumo, e adiciona-se uma mistura de nutrientes. Nesta mistura podem estar

incluídos, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaSO_4 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAP), K_3PO_4 , MgCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHSO_4 , ácido cítrico, citrato de sódio, ácido tartárico, tartarato de potássio, tartarato de sódio e de potássio de 4-hidratado, ácido málico, vitaminas, mio-inositol, peptona ou levedura comercial (McConnell e Schramm, 1995; Navratil *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2009; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010). Segundo o autor Roldán *et al.* (2011) a adição de pólen no mosto melhora a taxa de fermentação, a produção de álcool e os atributos sensoriais do hidromel.

Outra das etapas, é a redução da carga microbiana presente no meio de modo a não interferir nos processos fermentativos. O mosto pode ser esterilizado posteriormente, sendo o método de esterilização o mais utilizado (McConnell e Schramm, 1995; Navratil *et al.*, 2001; Ukpabi, 2006). No entanto, estes tratamentos térmicos alteram os perfis fenólicos alterando as suas propriedades antioxidantes (Wintersteen *et al.*, 2005). A literatura refere outras técnicas menos agressivas para reduzir a carga microbiana, nestas estão incluídas a utilização de meta bissulfito, consiste na adição de sais de sódio ou potássio que libertam dióxido de enxofre que elimina ou inibe a maioria dos microrganismos (McConnell e Schramm, 1995; Roldán *et al.*, 2011), o gás de dióxido de enxofre (Pereira *et al.*, 2009; Ukpabi, 2006); a pasteurização (Mendes Ferreira *et al.*, 2010); e a ultrafiltração são outros métodos utilizados (McConnell e Schramm, 1995). Algum destes métodos tem como inconveniente remover as proteínas por desnaturação e coagulação.

Após esta etapa, o pH do mosto deve ser ajustado para um intervalo de 3,7 a 4,0 com a adição de um tampão (McConnell e Schramm, 1995). O carbonato de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio, ácido tartárico são possíveis tampões usados para ajustar o pH. Contudo o aumento destes sais pode levar ao desenvolvimento de sabores como amargo e salgado (McConnell e Schramm, 1995).

Apesar da solução tampão, o pH desce durante a fermentação o que pode diminuir a eficiência da levedura, levando à produção do ácido acético e succínico (Sroka *et al.*, 2007) podendo levar ao abrandamento ou amuo da fermentação (Roldán, 2011). A hidratação da levedura de ser feita com mais de 10% em volume (McConnell e Schramm, 1995).

A fermentação deve ocorrer à temperatura ambiente segundo McConnell e Schramm. (1995), no entanto Navrátil *et al.* (2001) utilizou temperaturas a 25, 30, 35 e 40°C, Ukpabi (2006) temperaturas de 25 e 26°C, Pereira *et al.* (2009) a 27°C e Mendes-Ferreira *et al.* (2010) uma temperatura de 22°C.

1.2.2 Problemas associados à produção de hidromel

Durante a produção de hidromel, estão associados vários problemas, como por exemplo não atingir teor alcoólico pretendido ou a falta de uniformidade do produto final. Também pode ocorrer a refermentação pela levedura e/ou a fermentação secundária por bactérias que produzem ácido láctico e ácido acético aumentando a acidez indesejável e a produção de ésteres voláteis (Casellas, 2005). A conjugação destes compostos modifica a qualidade organolética do hidromel, especificamente o aroma e o sabor, tornando-o desagradável.

Foram efetuados alguns estudos, nomeadamente sobre variações no conteúdo de ácidos orgânicos durante a fermentação do mosto de hidromel (Sroka e Tuszyński, 2007). Estes investigadores identificaram e quantificaram os ácidos carboxílicos no mosto de hidromel e estudaram as transformações que ocorriam durante a fermentação, num grupo destes compostos. Verificaram que o mosto contém quantidades relativamente elevadas de ácidos gordos de cadeia média, maioritariamente ácidos decanóico (42 mg/L), dodecanóico (31 mg/L) e octanóico (26 mg/L), que se acredita inibirem a fermentação. Demonstraram, também, que nos primeiros dias de fermentação formam-se principalmente, os ácidos acético e sucínico, que vão baixar o pH do mosto, enquanto que o conteúdo em ácidos gordos decresce em 70-80%.

Os atrasos e os amuos das fermentações, outro problema encontrado no hidromel, deve-se ao facto do mel apresentar baixos níveis de substâncias azotadas e minerais, interferindo no processo fermentativo. Segundo Mendes-Ferreira *et al.* (2010) o ácido tartárico ajuda a prevenir o amuo da fermentação.

A quantidade de azoto assimilável inadequado no meio da fermentação pode levar a um deficiente crescimento da levedura, a fermentações prolongadas, taxas de crescimento reduzidas e conseqüentemente diminuir a produtividade. Os requisitos mínimos de azoto estão interligados com a taxa de crescimento da levedura e a concentração de etanol (Ivorra *et al.*, 1999).

Os requisitos mínimos de azotos são comandados pela taxa de crescimento da levedura que necessita nesse meio, no entanto, o nível de azoto na solução modifica o hidromel ao nível sensorial, pois a composição de aminoácidos afeta o metabolismo da levedura levando à produção de compostos voláteis aromáticos (Roldán, 2011).

Os diferentes tipos de mel também influenciam a fermentação, o mel escuro é mais rico em minerais que o mel claro interferindo assim na fermentação. Pereira *et al.* (2009) estudou a capacidade das Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para produzir hidromel, com mel da região de Trás-os-Montes. Este autor verificou que é de extrema importância as características do mel (tipo de mel utilizado), e os suplementos usados, para obter melhores resultados na produção de hidromel. Como esperado teve melhores resultados com o mel escuro do que com o mel claro, visto que o mel escuro é mais rico em minerais e pH é mais elevado.

No final da fermentação, o hidromel passa por um período de maturação, que inclui clarificação e filtração. Estes são obrigatórios, apesar de seus custos de produção serem elevados. Para a clarificação é frequentemente usada a bentonita (McConnell e Schramm, 1995; Pereira *et al.*, 2009; Roldán *et al.*, 2011), bem como a gelatina (Roldán *et al.*, 2011).

O tempo de fermentação ainda é um problema para a indústria, e tem sido alvo de estudos de modo a reduzir o tempo de fermentação, sem alterar a qualidade do produto, Pereira *et al.*, (2009) conseguiu fermentações com duração de 8 dias, utilizando méis claros e escuros onde foram enriquecidos com dois complementos diferentes. O autor Mendes-Ferreira *et al.* (2010) obteve fermentações com duração de 11 dias, utilizando tartarato de potássio, ácido málico e fosfato de diamónio.

Para utilizar o mel excedente na produção de hidromel, é necessário desenvolver novos estudos de modo a solucionar os problemas associados na produção de hidromel e obter um produto estável e de qualidade elevada.

1.3 Imobilização

Nos últimos anos, os sistemas de imobilização de células tem sido explorados para realização de fermentações alcoólicas. Os resultados alcançados nestas investigações são importantes na redução de custos de funcionamento, controlo dos processos de fermentação e aumento da qualidade do produto final (Champagne, *et al.*, 1992; Genisheva *et al.*, 2012).

A imobilização das células consiste em isolar as células, mantendo as suas atividades catalíticas em processos contínuos ou descontínuos possibilitando a reutilização das mesmas. O uso de microrganismos imobilizados permite o aumento da

produtividade, a síntese dos metabolitos e aumenta a eficiência da fermentação, devido à elevada concentração de células (Coelho, 2007; Covizzi *et al.*, 2007).

Os sistemas de imobilização das células nas fermentações apresentam vantagens relativamente a fermentações com células livres, nomeadamente a nível tecnológico e económico (Champagne, *et al.*, 1992; Inal e Yiğitoğlu, 2011; Genisheva *et al.*, 2012), possibilitando a sua utilização contínua de células e de proteção das células relativamente às substâncias inibidoras que possam estar presentes no meio (Vilela *et al.*, 2012). Como por exemplo, Ciani e Ferraro (1996) através de células de *Schizosaccharomyces pombe* encapsuladas em esferas de alginato de cálcio, conseguiu reduzir a acidez fixa do vinho degradando ácido málico.

As principais vantagens são o aumento da produtividade, elevado número de células no bioreator, possível reutilização da biomassa em processos descontínuos consecutivos, maior tolerância a substâncias inibidoras e eliminação de contaminações, menor formação de subprodutos, apresenta menor custos para o processo, redução dos custos com a centrifugação, filtração e purificação do produto final. (Champagne, *et al.*, 1992; Inal e Yiğitoğlu, 2011; Genisheva *et al.*, 2012). Contudo, uma das maiores vantagens é a sua reutilização principalmente quando os suportes escolhidos para a imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica.

A imobilização das células pode ser dividida em naturais ou artificiais. No que diz respeito às imobilizações naturais estão incluídas a formação de biofilmes e a adesão/ adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais. As imobilizações artificiais são a encapsulação em matrizes como o alginato de cálcio. A imobilização natural ocorre espontaneamente no meio através de interações eletrostáticas. Enquanto no caso das imobilizações artificiais, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando agentes ligantes como o glutaraldeído ou carboimidida (Covizzi *et al.*, 2007; Oliveira, 2011).

Existem várias técnicas de imobilização, estas podem ser: fixação a um suporte, o aprisionamento a uma matriz, a agregação de células porosas e por trás de uma barreira de contenção (Divies e Cachon, 2005; Genisheva *et al.*, 2012) (Fig. 1). Porém, existem vários materiais para imobilização de microrganismos. Estes podem ser orgânicos (a pele da uva, casca de laranja), inorgânicos (minerais), polímeros naturais (alginato de sódio, quitosano), polímeros sintéticos (poliacrilamida) (Dives e Cachon, 2005; Inal e Yiğitoğlu, 2011).

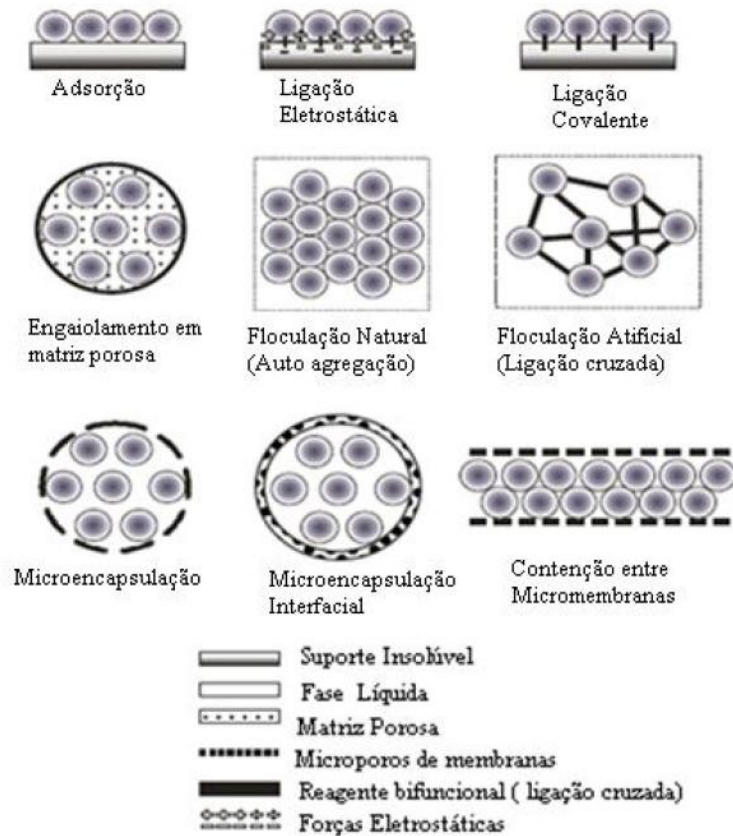


Figura 1: Diferentes imobilizações celulares de microrganismos. (Fonte: Pilkington *et al.* (1998)).

Bezbradica *et al.* (2007) obtiveram resultados bons com a imobilização da levedura da cerveja em álcool polivinil, onde obteve uma elevada taxa fermentativa, com uma quantidade de 10^9 células/mL, diminuindo assim a duração da fermentação. Além disso apresentou uma elevada estabilidade mecânica, visto que suportou trinta dias de fermentação em funcionamento durante seis meses sem alterar significativamente a atividade celular. No entanto, Genisheva *et al.* (2012) fez um estudo com leveduras imobilizadas em grainhas, onde obteve uma redução do tempo de fermentação assim como a concentração de SO_2 , com uma maior concentração em etanol.

As imobilizações com matrizes podem ser pelo método de engaiolamento, ou encapsulamento.

O método de engaiolamento segundo Covizzi *et al.* (2007) consiste na inserção das células numa malha artificial rígida ou semirrígida. Esta malha impede a passagem das células para o meio, no entanto possibilita a troca de nutrientes, metabolitos, gases

durante o processo de fermentação. A encapsulação, é outro método referido pelo autor, onde as células ficam circundadas por uma membrana não existindo uma malha entre as células.

A técnica de imobilizar células por engaiolamento consiste em misturar as células microbianas com o composto de polímeros com cargas negativas (como o alginato de sódio). Esta mistura é adicionada por gotejamento numa solução de íões de cálcio (cloreto de cálcio), formando um gel consistente e insolúvel, devido a ligações iónicas (Wang *et al.*, 2005; Dives e Cachon, 2005; Inal e Yiğitoğlu, 2011) (Fig.2). O tamanho das esferas vai depender da velocidade de fluxo, da densidade da solução do polímero e da concentração da solução de cálcio (Wang *et al.*; 2005). As esferas formadas apresentam um diâmetro que varia de 0,2mm a 2mm (Dives e Cachon, 2005).

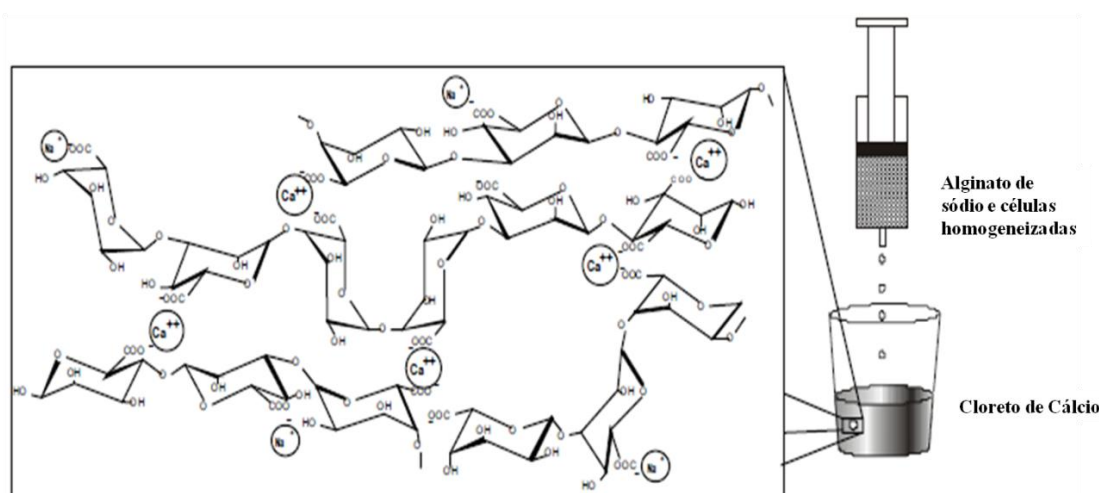


Figura 2: Formação das esferas (Covizzi *et al.*, 2007)

Esta técnica forma uma rede que permite as células trocarem com o exterior substratos e produtos indispensáveis para o crescimento e manutenção das células, a fim de garantir o seu crescimento (Groboillot *et al.*, 1994).

O método de encapsulação consiste em colocar as células na solução de cloreto de cálcio, que vai ser adicionada gota a gota na solução de polímeros ocorrendo a formação da cápsula (Wang *et al.*, 2005).

O método de imobilização por aprisionamento com polímeros naturais (engaiolamento) tem sido muito investigado, visto que se trata de um método simples e permite uma retenção celular eficiente, sem perda da atividade catalítica (Carvalho, 2000; Sarrouh, 2009).

A imobilização de células em alginato tem sido o polímero natural mais estudado para o aprisionamento de células viáveis devido à sua biocompatibilidade (Hernández *et al.*, 2010).

O alginato de sódio (NaAlg) é um polissacarídeo natural, derivado principalmente de algas marinhas castanhas (Najafpour *et al.*, 2004; Inal e Yiğitoğlu, 2011;). Este polissacarídeo geralmente é menos afetado pelo ataque microbiano em relação a outros hidratos de carbono (Inal e Yiğitoğlu, 2011). É um composto biocompatível, biodegradável, sem toxicidade, apresentando capacidade gelificante (Liouni, 2008; Inal e Yiğitoğlu, 2011). Segundo Carvalho (2006), a gelificação do alginato ocorre rapidamente sem que ocorra alterações drásticas ao nível da temperatura, pH e pressão osmótica, permitindo assim, preservar a viabilidade do microrganismo imobilizado.

O alginato é uma material barato e facilmente encontrado, podendo ser preparado em grandes quantidades de uma maneira fácil e rápida (Carvalho, 2006; Oliveira, 2011).

Nikolić *et al.* (2008), estudou a fermentação de etanol em milho com a levedura imobilizada em alginato de cálcio utilizando o método de geração de gotícula electrostático, obtendo uma maior tolerância ao etanol e nenhuma inibição do produto com células imobilizadas.

Vilela *et al.* (2013) estudou as células S26 em esferas de dupla camada de quitosano-alginato com vista a reduzir a acidez volátil de um vinho, conseguindo reduzir de 28 para 62% em 72 e 168 horas respetivamente a acidez, ocorrendo uma diminuição de etanol (0,7%). Portanto, as células imobilizadas S26 em dupla camada é uma alternativa para melhorarem a qualidade do vinho ao nível da acidez.

Segundo Inal e Yiğitoğlu (2011), a fermentação não é só influenciada pela imobilização das células, mas também pela composição da matriz. O conjunto do alginato de sódio e *N-vinyl-2-pyrrolidone* apresentam vantagens ao nível da produtividade e do rendimento em etanol.

No entanto todas estas vantagens dependem da estabilidade da matriz de imobilização. A matriz de imobilização deve ser inerte, insolúvel, não biodegradável e mecanicamente estável durante as diferentes operações num biorreator. A estabilidade mecânica depende nomeadamente das propriedades viscoelásticas e da concentração da solução de alginato de sódio. A levedura adicionada tem uma mudança significativa na elasticidade da amostra (Kostov *et al.*, 2010).

O problema mais comum que ocorre durante a fermentação alcoólica é a libertação das células do interior das esferas para o exterior, devido à destabilização do gel. Esta rutura ocorre devido ao crescimento celular, à formação e acumulação de CO₂ (Drichoutis, 2007; Liouni, 2008, Vilela *et al.*, 2012), à presença de iões não gelificantes, nomeadamente Mg⁺, Na⁺ ou K⁺ e a presença de agentes quelantes (lactato, citrato ou fosfato) (Drichoutis 2007; Vilela *et al.*, 2012). A distribuição do O₂ é importante, porque a aeração não uniforme pode originar a migração das células para o meio, levando ao rompimento do gel (Covizzi *et al.*, 2007).

Com este trabalho pretende-se avaliar o efeito das células *Saccharomyces cerevisiae* immobilizadas em alginato na fermentação do hidromel. Simultaneamente pretende-se avaliar a eficiência da reutilização da *Saccharomyces cerevisiae* immobilizada em alginato. Paralelamente estudou-se a influência da concentração de alginato na eficiência da fermentação.

CAPÍTULO 2: Material e Métodos



2 Material e Métodos

Para avaliar o efeito da reutilização de células imobilizadas na produção de hidromel, foi utilizado mel escuro de segunda categoria. A qualidade do mel foi avaliada através das análises físico-químicas e polínicas.

Para a produção de hidromel as células de levedura foram imobilizadas em duas concentrações diferentes de alginato, 2% e a 4% (m/v) em ensaios conduzidas com 3 amostras. As fermentações foram monitorizadas diariamente através da medição da densidade ótica, quantificação das células viáveis e quantificação de açúcares redutores. Para caracterizar o hidromel produzido, no final da fermentação foram determinados os parâmetros enológicos, pH, azoto assimilável, acidez total, acidez volátil, sulfuroso total e teor alcoólico.

2.1 Caracterização Físico-química e Polínica do mel

Para a produção de hidromel foi utilizado mel escuro de segunda categoria da região de Trás-os-Montes. A qualidade do mel foi avaliada através da determinação de alguns parâmetros estabelecidos na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de Setembro) e da avaliação do espectro polínico.

2.1.1 Humidade

O teor em água do mel foi determinado através do método refractométrico segundo os Métodos Harmonizados da Comissão Internacional do Mel (IHC) (2002). A amostra de mel foi homogeneizada e a leitura foi feita com um refratómetro Abbe (digital refractómetro Atago, Alemanha). Os resultados foram expressos em % (p/p).

2.1.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica presente no mel foi determinada pelo método descrito por Sancho *et. al.* (1991).

Dissolveram-se 10 g de mel em 75 ml de água destilada, a solução foi colocada em banho-maria a 20°C e, após se atingir o equilíbrio da temperatura, realizou-se a leitura no condutivímetro Inolab Cond Level 2 (Fig. 3).

A condutividade elétrica do mel foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Condutividade elétrica (mS cm}^{-1}\text{)} = \text{valor lido} \times 1.50$$



Figura 3: Condutivímetro (Inolab Cond Level 2.)

2.1.3 Cinzas totais

O teor em cinzas presente no mel foi determinado através do valor da condutivimetria, segundo a metodologia descrita por Sancho *et al.* (1991). Para condutividades inferiores a $0,9 \times 10^{-3}$ S/cm, o valor converteu-se para 10^{-4} S/cm e recorreu-se a uma tabela proposta por Sancho *et. al* (1991) (Fig. 4) para determinação do conteúdo em cinzas totais (resultados expressos em %). Para valores de condutividade superiores a $0,9 \times 10^{-3}$ S/cm, o teor em cinzas foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{Cinzas totais (\%)} = 0.083 \times \text{condutividade} - 0.092$$

Tabla II (continuación)

Conductividad 10^{-4} S cm $^{-5}$	% de cenizas			Alcalinidad de las cenizas (ml de ácido 1N/100 g miel)			% de cenizas sulfatadas
	Totales	Solubles	Insolubles	Solubles	Insolubles	Total	
5,6	0,37	0,28	0,09	3,56	1,38	4,94	0,58
5,7	0,38	0,29	0,09	3,64	1,41	5,05	0,59
5,8	0,39	0,29	0,10	3,72	1,44	5,16	0,60
5,9	0,40	0,30	0,10	3,79	1,48	5,27	0,62
6,0	0,41	0,31	0,10	3,87	1,50	5,37	0,63
6,1	0,41	0,31	0,10	3,95	1,53	5,48	0,64
6,2	0,42	0,32	0,10	4,02	1,57	5,59	0,65
6,3	0,43	0,32	0,11	4,10	1,60	5,70	0,67
6,4	0,44	0,33	0,11	4,18	1,62	5,80	0,68
6,5	0,45	0,34	0,11	4,26	1,65	5,91	0,69
6,6	0,46	0,35	0,11	4,33	1,69	6,02	0,70
6,7	0,46	0,35	0,11	4,41	1,72	6,13	0,71
6,8	0,47	0,35	0,12	4,49	1,74	6,23	0,73
6,9	0,48	0,36	0,12	4,56	1,78	6,34	0,74
7,0	0,49	0,37	0,12	4,64	1,81	6,45	0,75
7,1	0,50	0,38	0,12	4,72	1,84	6,56	0,76
7,2	0,51	0,38	0,13	4,80	1,86	6,66	0,77
7,3	0,51	0,38	0,13	4,87	1,90	6,77	0,79
7,4	0,52	0,39	0,13	4,95	1,93	6,88	0,80
7,5	0,53	0,40	0,13	5,03	1,96	6,99	0,81
7,6	0,54	0,41	0,13	5,10	1,99	7,09	0,82
7,8	0,56	0,42	0,14	5,26	2,05	7,31	0,85
7,9	0,56	0,42	0,14	5,34	2,08	7,42	0,86
8,0	0,57	0,43	0,14	5,41	2,11	7,52	0,87
8,1	0,58	0,44	0,14	5,49	2,14	7,63	0,88
8,2	0,59	0,44	0,15	5,57	2,17	7,74	0,90
8,3	0,60	0,45	0,15	5,65	2,20	7,85	0,91
8,4	0,61	0,46	0,15	5,72	2,23	7,95	0,92
8,5	0,62	0,47	0,15	5,80	2,26	8,06	0,93
8,6	0,62	0,47	0,15	5,88	2,29	8,17	0,94
8,7	0,63	0,47	0,16	5,96	2,32	8,28	0,96
8,8	0,64	0,48	0,16	6,03	2,35	8,38	0,97
8,9	0,65	0,49	0,16	6,11	2,38	8,49	0,98
9,0	0,66	0,50	0,16	6,19	2,41	8,60	0,99

Figura 4: Tabela para a determinação da percentagem de cinzas totais (fonte: Sancho et al., 1991).

2.1.4 pH

O pH do mel foi determinado segundo o método descrito por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 ml de água destilada, a solução foi colocada em banho-maria a 20°C e após o equilíbrio da temperatura ser atingido, o pH foi determinado no medidor de pH Meter Basic 20 (fig. 5).



Figura 5: Medidor de pH (Meter Basic 20)

2.1.5 Acidez

A acidez do mel foi determinada de acordo com o método proposto por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 10 g de mel em 75ml de água destilada, adicionaram-se de seguida 4 a 5 gotas do indicador de pH, solução alcoólica de fenolftaleína, e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N (Merck, Darmstadt, Germany) até ocorrer a mudança de cor que persistiu durante 10 segundos.

O resultado da acidez do mel foi obtido através da fórmula:

$$\text{Acidez (miliequivalentes de ácidos/ Kg de mel)} = \text{volume gasto de NaOH (L) } 0,1 \text{ N} \times 10$$

2.1.6 Hidroximetilfurfural (HMF)

O conteúdo de hidroximetilfurfural do mel foi determinado segundo o método descrito pelo IHC (2002).

Dissolveram-se 5 g de mel em 25 mL de água destilada e transferiram-se para um balão de 50 mL. A esta solução adicionaram-se 0,5 mL de solução de Carrez I e 0,5 mL de solução de Carrez II, agitou-se e perpez-se o volume do balão com água destilada.

De seguida, filtrou-se a solução previamente preparada e desprezaram-se os primeiros 10 mL de filtrado. Colocaram-se 5 mL do filtrado em 2 tubos de ensaio, onde, num dos tubos se adicionou 5 mL de bissulfito de sódio 0,1% (Acros Organics, Belgium) (branco) e no outro adicionou-se 5 mL de água destilada (amostra). Misturou-se bem e leu-se a absorvência a dois comprimentos de onda, 284 e 336 nm, num espectrofotómetro Varian Cary 50 Scan Uv-Visível.

O teor em HMF do mel for determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{mg HMF/Kg mel} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149,7 \times (5/\text{g amostra})$$

2.1.7 Índice Diastásico

O índice diastásico do mel foi determinado com base no método proposto por Anónimo (1986).

Pesaram-se 10 g de mel e dissolveram-se em 5 mL de tampão acetato (Merck, Darmstadt, Germany) a pH 5,3 e 20 mL de água destilada. Num balão volumétrico de 50 mL, colocaram-se 3mL de cloreto de sódio 0,5 M (Panreac Química SA, Barcelona, Spain), a amostra de mel previamente dissolvida e perpez-se o volume com água destilada. Transferiram-se 10 mL desta solução para dois balões de 50 mL (um balão é para a solução amostra e outro é para a solução de referência) que foram colocados num banho-maria a 40°C, juntamente com a solução de amido (Merck, Darmstadt, Germany) com um índice de azul entre 0,5 e 0,55 (anexo I). Após 15 minutos no banho, pipitaram-se 5 mL de água destilada para o balão de referência e 5 mL de solução de amido (Merck, Darmstadt, Germany) para o balão amostra. Em intervalos de tempo de 5 minutos transferiu-se 1 mL dos balões de referência e do balão amostra para balões volumétricos de 50 mL que continham 10 mL de solução de iodo 0,0007 N e 35 mL de água destilada. Leu-se absorvência a um comprimento de onda de 660 nm, da amostra

contida no balão amostra usando o balão de referência para fazer o branco, recorrendo a um espectrofotômetro Varian Cary 50 Scan Uv-Visível. A absorvência das amostras foi lida de 5 em 5 minutos até atingir um valor inferior a 0,235.

O índice diastásico (escala de Schade) do mel foi determinado pela seguinte fórmula: Índice diastásico = 300/ tempo (minutos).

2.1.8 Açúcares Redutores

O teor em açúcares redutores (glucose e frutose) do mel foi determinado de acordo com o método descrito por Bogdanov *et al.* (1997).

Dissolveram-se 2 g de mel em 50 mL de água destilada, transferiram-se para um balão de 200 mL e perpez-se o volume com água destilada (solução de mel). Retiraram-se 50 mL da solução de mel para um balão volumétrico de 100 mL e perpez-se o volume com água destilada (solução diluída de mel).

Num copo graduado de 250 mL adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, 7 mL de água destilada e 14 mL da solução diluída de mel, previamente colocada numa bureta de 25 mL. Aqueceu-se a solução contida no copo até à ebulição e deixou-se ferver durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1mL de azul metileno 0,2%. Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel contida na bureta até que ocorreu a mudança de cor. O volume gasto da solução diluída de mel foi subtraído a 25 mL, e este valor correspondeu ao volume de água que foi usado na dosagem. Para a dosagem, num copo graduado de 250 mL adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, o volume de água previamente determinado e 12,5 mL de solução diluída de mel contida na bureta. A solução foi aquecida, ferveu durante 2 minutos e adicionou-se 1 mL de azul metileno 0,2%, e de seguida foi titulada com a solução diluída de mel contida na bureta até ocorrer a mudança de cor.

Para a determinação dos açúcares redutores do mel recorreu-se à seguinte expressão:

Teor em açúcares redutores (g/100 g de mel) = $\frac{2000}{P \times V}$, onde o P é o peso da amostra de mel (2 g) e o V o volume da solução diluída de mel gasto na dosagem.

2.1.9 Sacarose aparente

O teor em sacarose aparente do mel foi determinado pelo método de inversão segundo Bionchi (1990).

Dissolveram-se 2 g de mel em 200 mL de água destilada (solução de mel), retiraram-se 50 mL para um balão volumétrico de 100 mL e adicionaram-se 25 mL de água destilada. A solução foi colocada em banho-maria a 64 °C e após ter atingido esta temperatura, retirou-se e adicionaram-se 10 mL de HCL 6,34 N (Panreac Quimica SA. Barcelona, Spain). Após arrefecer à temperatura ambiente, neutralizou-se com NaOH 5N (Merck, Darmstadt, Germany) confirmando com papel indicador completou-se o volume até aos 100ml (solução diluída de mel).

Repetiu-se a metodologia usada no método da determinação dos açúcares redutores, após ter promovido a inversão.

O teor em sacarose aparente do mel foi determinado através da seguinte equação:
Sacarose aparente (g/100 g de mel) = (Teor em açúcar invertido depois da inversão – Teor em açúcar invertido antes da inversão) × 0,95

Em que o teor em açúcar invertido antes da inversão corresponde ao teor em açúcares redutores do mel.

2.1.10 Análises Polínicas

A análise polínica do mel foi determinada pelo método descrito por Louveaux *et al.* (1978).

Dissolveram-se 10 g de mel em 15 mL de água acidulada (solução de ácido sulfúrico 5 %) que foi colocado num banho-maria a 40°C até se dissolver.

Esta solução foi centrifugada a (Eppendorf Centrifuge 5810R) a 2600 rpm durante 10 minutos.

Eliminou-se o sobrenadante e adicionaram-se 10 mL de água destilada e centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 2600 rpm. Esta etapa foi repetida mais uma vez e eliminou-se o sobrenadante. Efetuou-se uma preparação microscópica com uma gota do sedimento e uma pequena porção de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. Os diferentes tipos de pólen presentes na amostra foram identificados e quantificados.

2.2 Produção de hidromel

Para avaliar o efeito da reutilização de células imobilizadas na produção de hidromel foi utilizada a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* ICV D47. Esta levedura foi selecionada considerando os resultados obtidos por Pereira *et al.* (2013) e as suas características enológicas. A levedura foi imobilizada em 2 e 4 % de alginato e as esferas foram reutilizadas em 5 fermentações sucessivas de hidromel. Como controlo realizou-se uma fermentação nas mesmas condições e com a mesma estirpe na forma livre.

2.2.1 Preparação do mosto-mel

Para obter uma bebida alcoólica com uma percentagem de aproximadamente, 12% de etanol, o mel foi dissolvido em água comercial engarrafada (314 g/L). A mistura mel-água foi suplementada com nutrientes comerciais (Enovit) (60g/hL) e após homogeneização da mistura, acertou-se o pH a 3,8 com ácido tartárico (Sigma-Adrich). O mosto-mel foi pasteurizado a 70 °C durante 30 minutos e imediatamente arrefecido. Para caracterizar o mosto-mel antes da fermentação determinaram-se os parâmetros físico-químicos °Brix, pH, azoto assimilável, acidez total e açúcares redutores.

2.2.2 Hidratação e imobilização da levedura

A levedura enológica comercial selecionada para a produção de hidromel foi a *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin ICV D47 (Lallemand, Montreal, Canada).

De acordo com as instruções da ficha técnica, a levedura seca ativa (30 g/hL) foi hidratada na proporção de 1 Kg de levedura para 10 L de água esterilizada. A suspensão foi colocada em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos e depois foi agitada algumas vezes durante 20 minutos. O tempo de hidratação não excedeu os 40 minutos.

Para a imobilização da levedura foram utilizadas as concentrações de 2 e 4% (w/v) de alginato de sódio (BDH Prolabo, Leuveu, Belgica). O alginato de sódio foi dissolvido em água destilada e autoclavado a 121°C durante 15 minutos. A levedura, após hidratação, foi adicionada às respetivas soluções de alginato. Para a formação das

esferas, a mistura polímero-células foi vertida para uma seringa e deixou-se gotejar para uma solução esterilizada de CaCl_2 0,18 M (Panreac, Barcelona, Spain), com agitação (fig 6). As esferas ficaram nesta solução durante 30 minutos a 4°C para endurecerem. Antes da inoculação, as esferas foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada.



Figura 6: Procedimento de imobilização das células de levedura em 2% de alginato.

2.2.3 Condições e monitorização da fermentação

Distribuíram-se 300 mL de mosto-mel em erlenmeyers de 500 mL, previamente esterilizados, e inoculou-se com a levedura na forma livre ou imobilizada. As fermentações decorreram a 25°C , numa incubadora (TH 25 Edmund Bühler 3019) com agitação de 120 rpm. A fermentação foi monitorizada diariamente através quantificação dos seguintes parâmetros: açúcares redutores, biomassa celular e viabilidade celular.

A biomassa celular foi avaliada através da medição da densidade ótica a 640 nm num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Helios, 1997). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras com mosto-mel, que também foi usado como branco.

As taxas específicas de crescimento (μ) foram calculadas a partir do declive da relação linear entre os valores da densidade ótica, a 640 nm, e o tempo de fermentação, de acordo com a seguinte equação:

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

em que μ corresponde à taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo (h^{-1}), e N_t e N_0 à densidade populacional, expressa pela D.O. a 640 nm, ao fim do tempo t e t_0 , respetivamente.

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

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) de acordo com o procedimento proposto por Miller (1959), usando a glucose como padrão. Colocaram-se 500 μ L de amostra centrifugada num tubo de ensaio e adicionaram-se 500 μ L de reagente de DNS. Os tubos foram colocados durante 5 minutos num banho termostatizado a 100°C, e após esse tempo ficaram a arrefecer à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se 5 mL de água destilada, agitou-se a mistura e leu-se a absorvância num espectrofotómetro UV-Visível (Varian Cary 50 Scan model, 1998) a 540nm. Preparou-se um ensaio com água destilada para efetuar o ajuste do zero do espectrofotómetro. Quando necessário efetuaram-se diluições da amostra com água destilada. Os resultados dos açúcares redutores foram expressos em g/L.

No final da fermentação alcoólica, o hidromel obtido foi clarificado por centrifugação para avaliar as suas características físico-químicas através de diversos parâmetros enológicos.

2.2.4 Caracterização físico-química do mosto-mel e hidromel

Para determinar as características do mosto-mel antes da fermentação e avaliar a qualidade do hidromel produzido foram efetuadas diversas análises físico-químicas no início e fim das fermentações. Para caracterizar o mosto-mel foram determinados o pH, °Brix, acidez total e azoto assimilável. No final das fermentações os hidroméis produzidos foram avaliados quanto ao pH, sulfuroso (SO_2) total, acidez total, acidez volátil, azoto assimilável, teor alcoólico. Determinou-se ainda o rendimento em etanol de cada fermentação.

2.2.4.1 pH

O pH do mosto-mel e hidromel foi determinado por leitura direta utilizando um medidor de pH Meter Basic 20, (Organização Internacional da Vinha e do Vinho, OIV, 1990).

2.2.4.2 Acidez total

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

O método consiste numa titulação potenciométrica com NaOH 0.1 N na presença de azul de bromotimol como indicador de pH. Assim, numa capsula adicionou-se 5 mL de solução tampão, para titular a amostra, colocou-se numa capsula com uma banda magnética adicionaram-se 30 ml de água destilada, 10 mL de amostra e 1 mL de azul de bromotimol, e titulou-se com NaOH 0,1 N até se verificar mudança de cor.

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

$$\text{Acidez total}_{\text{ácido tartárico}} (\text{g/L}) = \text{volume de NaOH gasto (L)} \times 0.75$$



Figura 7: Determinação da acidez total.

2.2.4.3 Azoto assimilável

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

Num copo de 50 mL colocaram-se 10 mL de amostra clarificada e 15 mL de água destilada, e acertou-se o pH a 8,1 com NaOH 0,1 N usando um medidor de pH (Meter Basic 20). Adicionou-se 2,5 mL de formaldeído (Panreac Quimica SA., Barcelona, Spain) a pH 8,1 (formaldeído a 37 % acertada a pH 8,1 com NaOH 0,1 N), esperou-se 5 minutos e titulou-se com NaOH 0,05 N até atingir um valor de pH 8,1.

Os resultados foram calculados pela seguinte expressão:

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

2.2.4.4 °Brix

O °Brix foi determinado por refratometria no mosto-mel utilizando um refratómetro portátil (Zuzi serie 300) (OIV, 2006).

2.2.4.5 Sulfuroso total

A determinação do SO₂ total do hidromel foi efetuada de acordo com a metodologia de Ripper descrita pela OIV (1990) como método rápido. A determinação baseia-se na titulação iodométrica direta em meio ácido (Curvelo-Garcia, 1988). Nuns almofarizes colocaram-se 25 mL de hidromel e 10 mL de NaOH 1 N, agitou-se e deixou-se repousar durante 5 minutos. De seguida adicionou-se 2,5 mL de cozimento de amido 1 % e 5 mL de H₂SO₄ 1/3. Titulou-se com solução de iodo 0,02 N até ocorrer a mudança de cor.

Os resultados foram calculados através da seguinte expressão:

$$\text{SO}_2 \text{ total} = \text{volume de solução de iodo gasto} \times 25,6$$

2.2.4.6 Acidez volátil

A acidez volátil do hidromel foi determinada pelo método descrito pela OIV (1990) e consiste numa titulação dos ácidos voláteis que foram obtidos por destilação utilizando o aparelho Cazenave-Ferré (Fig. 8).

Colocou-se 10 ml de hidromel no borbulhador do aparelho e recolheu-se 100 ml do destilado. Ao destilado adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com NaOH 0,1 N até ocorrer a mudança de cor para rosa (estável pelo menos durante 15 segundos).

Os resultados da acidez volátil foram obtidos através da fórmula:

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



Figura 8: Aparelho de Cazenave-Ferré

2.2.4.7 Teor alcoólico

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

Inicialmente verificou-se a temperatura de ebulição da água e marcou-se no disco do aparelho a temperatura registada. De seguida, colocou-se o hidromel no ebulímetro (Fig. 9) para determinar a sua temperatura de ebulição e verificou-se no disco o teor alcoólico correspondente à temperatura lida. Os resultados são expressos em % vol.



Figura 9: Ebuliómetro

2.2.4.8 Rendimento da fermentação

Na produção de hidromel, calcularam-se os rendimentos da fermentação em etanol, de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{\text{Etanol}} (\%) = \frac{\text{Açúcares consumidos (g/L)}}{\text{Etanol produzido}} \times 100$$

2.2.5 Caracterização das esferas de alginato no final da fermentação

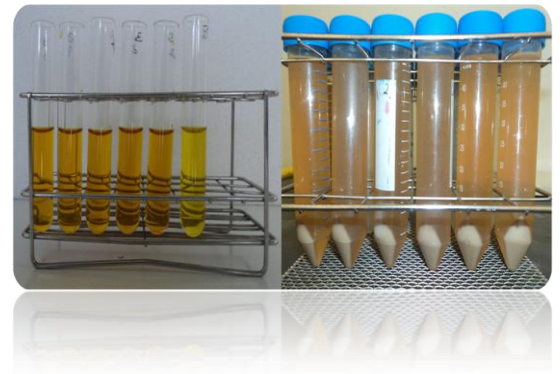
No final da quinta reutilização, para determinação da concentração de células viáveis nas esferas com 2 e 4% de alginato, as esferas foram liquefeitas usando um método químico, de acordo com o procedimento adaptado de Göksungur e Zorlu (2001). Pesaram-se 50 esferas que foram dissolvidas em 50 ml de uma solução esterelizada de citrato de sódio 50 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha), com agitação contínua durante aproximadamente 1 hora, à temperatura ambiente. A viabilidade celular foi determinada através da quantificação das UFC's em meio YPD, incubado a 25°C durante 3-5 dias.

2.2.6 Tratamento estatístico

A análise estatística dos dados foi efetuada utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 17.0. O cumprimento do requisito da

ANOVA, nomeadamente a homogeneidade de variância foi avaliada através do teste de Levene. Todas as variáveis dependentes foram analisadas através da ANOVA a um fator e quando se verificaram diferenças significativas, as médias foram comparadas usando o teste de Tukey, teste de comparações múltiplas. Todos os testes estatísticos foram realizados para um nível de significância de 5 %.

CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão



3 Efeito da reutilização das células imobilizadas em alginato na produção de hidromel

A utilização de células imobilizadas em fermentações alcoólicas tem sido alvo de vários estudos. Estes sistemas de imobilização de células apresentam inúmeras vantagens relativamente a fermentações com células livres, nomeadamente o aumento da produtividade, reutilização da biomassa em processos descontínuos consecutivos, maior tolerância a substâncias inibidoras e eliminação de contaminações, menor formação de subprodutos. Permite também reduzir os custos do processo, centrifugação, filtração e purificação do produto final (Champagne, *et al.*, 1992; Inal e Yiğitoğlu, 2011; Genisheva *et al.*, 2012).

3.1 Caracterização físico-química e polínica do mel

Para a produção de hidromel utilizou-se mel escuro proveniente da região de Trás-os-Montes, de segunda categoria, ou seja, um mel obtido durante o processamento do mel e considerado desperdício. Na caracterização deste mel, utilizado na produção de hidromel, foram efetuadas análises físico-químicas de acordo com a legislação portuguesa Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro de forma a avaliar a sua qualidade. Foram efetuadas as seguintes análises físico-químicas: determinação da humidade, pH, acidez volátil, condutividade elétrica, cinzas totais, Índice diastásico, hidroximetilfurfural (HMF), sacarose aparente e açúcares redutores.

Para determinar a origem botânica do mel analisou-se o espectro polínico. A contagem dos poléns presentes no mel foi efetuada por microscopia conforme, descrito na secção Material e Métodos. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil polínico do mel escuro.

	Pólen	%	
Mel escuro	<i>Erica</i> sp.	12,24	PI
	<i>Castanea</i> sp.	73,47	PD
	<i>Prunus</i> sp.	3,06	PI
	<i>Echium</i> sp.	6,12	PI
	<i>Trifolium</i> sp.	5,11	PI

PI – Pólen isolado; PD – Pólen dominante

Da análise da Tabela 1 verifica-se que o mel em estudo é monofloral de *Castanea sativa* (73,47%) de acordo com a classificação de Maia (2005).

Na Tabela 2 encontram-se representados os resultados obtidos nas análises físico-químicas de acordo com o estipulado no Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 Setembro. Estas análises devem ser efetuadas a todo o tipo de mel utilizado na produção de hidromel, pois a qualidade desta bebida alcoólica depende das características da matéria-prima utilizada na sua produção. Estas análises revestem-se de particular importância no nosso trabalho pois foi utilizado mel de segunda categoria, isto é, mel de lavagens e mel utilizado na alimentação das abelhas.

Tabela 2: Análises físico-químicas realizadas ao mel

Parâmetros Físico-químicos	Mel
Humidade (%)	17,25
Acidez (meq. Ac/Kg)	16,00
Condutividade Elétrica (mS/cm)	0,80
Cinzas Totais (%)	0,56
pH	4,47
Índice Diastásico (escala de Schade)	13,34
HMF (mg/Kg)	8,26
Açúcares Redutores (%)	62,35
Sacarose Aparente (%)	8,93

Os parâmetros analisados encontram-se dentro dos valores estabelecidos no Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, à exceção da sacarose aparente, deve ser no máximo de 5g/100g para os méis em geral e neste caso obteve-se 8,39g/100g.

O teor de água presente no mel é um parâmetro importante na qualidade, pois permite prever a duração do produto e a capacidade para se manter estável (Bogdanov *et al.*, 2004). Quanto maior o teor em água maior a probabilidade do mel fermentar durante o armazenamento levando à sua deterioração e perda do *flavour* e, conseqüentemente à diminuição do tempo de vida de prateleira (de Rodríguez *et al.*, 2004; Vargas, 2006; Al *et al.*, 2009). O teor em humidade do mel, neste caso encontra-se, de acordo com o estipulado na legislação portuguesa (<20%), sugerindo que o mel foi extraído, processado e armazenado seguindo as boas práticas de fabrico.

A acidez livre depende da origem floral do mel e deve-se à presença de ácidos orgânicos, resultante quer da degradação da glucose pela ação da enzima glucose oxidase com produção de ácido glucónico (a ação desta enzima mantém-se mesmo durante o armazenamento), quer da ação de bactérias durante a maturação do mel. Assim, este parâmetro é um indicador da ocorrência de fermentações no mel indicando (Acquarone *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007). A acidez livre também depende da qualidade de minerais presentes no mel (Silva e Beserra, 2001).

A legislação portuguesa determina que o mel de qualidade deve possuir menos de 50 miliequivalentes de ácidos por 1000g de mel. Neste trabalho o mel analisado apresentou um valor bastante inferior (16 miliequivalentes de ácidos por 1000g de mel).

O valor de pH não está diretamente relacionado com a acidez, devido à ação tampão de ácidos e minerais presentes no mel (Abu-Tarboush *et al.*, 1993). O pH não consta atualmente como análise obrigatória de controlo de qualidade do mel. No entanto o pH do mel é muito importante porque influencia o desenvolvimento de microrganismos além de condicionar a velocidade de formação do HMF (Souza e Bazlen, 1998).

Segundo Iurlina e Fritz (2005) o pH nos méis varia entre 3,4 e 6,1 sendo a média de 3,9. No mel estudado o pH foi de 4,47 valor dentro dos limites, mas acima da média.

A condutividade elétrica pode ser usada na determinação de origem botânica do mel. De acordo com o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro do mel de melada, mel de flores de castanheiro e misturas desses méis devem conter no mínimo 0,8 mS/cm, enquanto os outros méis não enumerados no Decreto-Lei devem apresentar menos de 0,8 mS/cm.

O valor obtido para o mel analisado no nosso trabalho foi de 0,8 mS/cm, seguindo que a origem botânica deste mel é de *Castanea sativa* informação confirmada pelo espectro polínico, tendo-se verificado a predominância de *Castanea sp.*

O teor de cinzas expressa o conteúdo de minerais presentes nos alimentos. No caso do mel a qualidade mineral está relacionada com a origem botânica, meio ambiente e condições de produção e processamento. No Decreto-Lei português não existe especificações quanto ao teor de cinzas presente no mel, mas a legislação Brasileira determina o teor máximo de 0,6% para os méis florais e de 1,2% tanto para méis de melada, como para a mistura deste com méis florais. O valor de 0,56% obtido neste trabalho indica uma elevada percentagem de sais contrastando com os valores obtidos por de Rodríguez (2004) (0,19 a 0,4) em méis produzidos na Venezuela.

Segundo Al *et al.*, (2009) o teor em minerais é o fator que mais influencia a cor do mel. Quanto maior o teor em minerais mais escura vai ser a cor do mel. Tal como se pode verificar na figura 10.



Figura 10: Mel de cor escura usado na experiencia

A diástase é um grupo de enzimas (α e β –amilases), segregadas pela abelha que hidrolisam o amido, originando dextrinas e maltose, respetivamente. Esta enzima é termo sensível. Assim, a determinação do índice diastásico tem sido utilizado para avaliar sobreaquecimento durante o processamento e armazenamento do mel (Vargas, 2006), e, para detetar adulterações do produto (Aroucha *et al.*, 2008). O Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro estabelece atividade diastásica o mínimo de 0,8 na escala de Schade, os méis com baixo teor enzimático, como é o caso do mel proveniente de

citrinos devem ter como mínimo de atividade diastásica no mínimo de 3 na escala de Göthe, mas sempre que o conteúdo de HMF não exceda os 15mg/kg.

A atividade diastásica é um índice de frescura do mel, mas deve ser interpretada juntamente com o teor em hidroximetilfurfural (HMF) (Valbuena,1992). O índice diastásico diminui com o tempo de armazenamento, ou abuso da temperatura (Vargas, 2006; Fallico *et al.*, 2006). O HMF é um composto formado pela desidratação das hexoses em condições ácidas e a sua cinética de formação varia diretamente com a temperatura, diminuindo desta forma o valor nutritivo do produto. A presença de HMF influencia diretamente a cor, sabor e odor estranhos, sendo por isso utilizado como um parâmetro de qualidade do mel (Valbuena, 1992). O mel, normalmente, tem na sua constituição pequenas concentrações de HMF, concentrações mais elevadas indicam sobreaquecimento, armazenamento prolongado e adulteração (Vargas, 2006). O Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 Setembro indica que a quantidade de HMF não deve exceder os 40mg/kg. O mel estudado apresentou 13,34 de índice diastásico e 8,26 de HMF indicando que durante o processamento foram respeitadas as boas práticas de fabrico que o mel é jovem e não sofreu adulteração.

A glucose e a frutose são os principais açúcares redutores presentes no mel (Küçük *et al.*, 2007). O Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 Setembro estabelece para o mel de néctar o valor mínimo de glucose e frutose de 60g/100g. Como se pode observar na Tabela 2 o mel analisado cumpre este requisito.

A concentração de sacarose é utilizada para diferenciar os méis monoflorais dos multiflorais (Carillo,1998), indicando elevados teores uma recolha prematura, ou seja, a sacarose ainda não foi convertida em frutose e glucose (Azeredo *et al.*, 2003). O Decreto-Lei estabelece para os méis monoflorais de *Robinia pseudoacacia* (falsa acácia), *Medicago sativa* (luzerna ou alfalfa), *Banksia menziesii* (Mensies Banksia), *Hedysarum* (hedisaro), *Eucalyptus camadulensis*, *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milligani*, *Citrus* spp. (citrinos) o limite máximo de 10g/100g, para os méis *Lavandula* spp.(rosmaninho, alfazema), *Borago officinalis* (borragem) o limite máximo de 15g/100g e para todos os outros méis o limite máximo de 5g/100g. Da análise dos nossos resultados observou-se que o valor obtido (8,93g/100g) se encontra acima do valor estabelecido pelo Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 setembro sugerindo uma recolha prematura.

Resumindo o mel utilizado para a produção de hidromel segundo os parâmetros do Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 setembro é um mel de boa qualidade, apesar de ser um mel de segunda categoria.

3.2 Produção de hidromel utilizando células imobilizadas em esferas de alginato

Neste trabalho avaliou-se a possibilidade de reutilizar de células imobilizadas e a influência da concentração de alginato (2% e 4%) na performance fermentativa *S. cerevisiae*, utilizada na produção de hidromel. As células imobilizadas com duas concentrações de alginato foram utilizadas em várias fermentações sucessivas.

Neste trabalho utilizou-se uma concentração de inóculo 10^6 UFC's/mL de inóculo pois, segundo o descrito por Pereira *et al.* (2013) é a concentração mais adequada para a produção de hidromel.

Após a imobilização de 10^6 UFC's/mL em 2% e 4% de alginato as esferas obtidas foram utilizadas em cinco fermentações sucessivas segundo o esquema representando na Fig. 11.

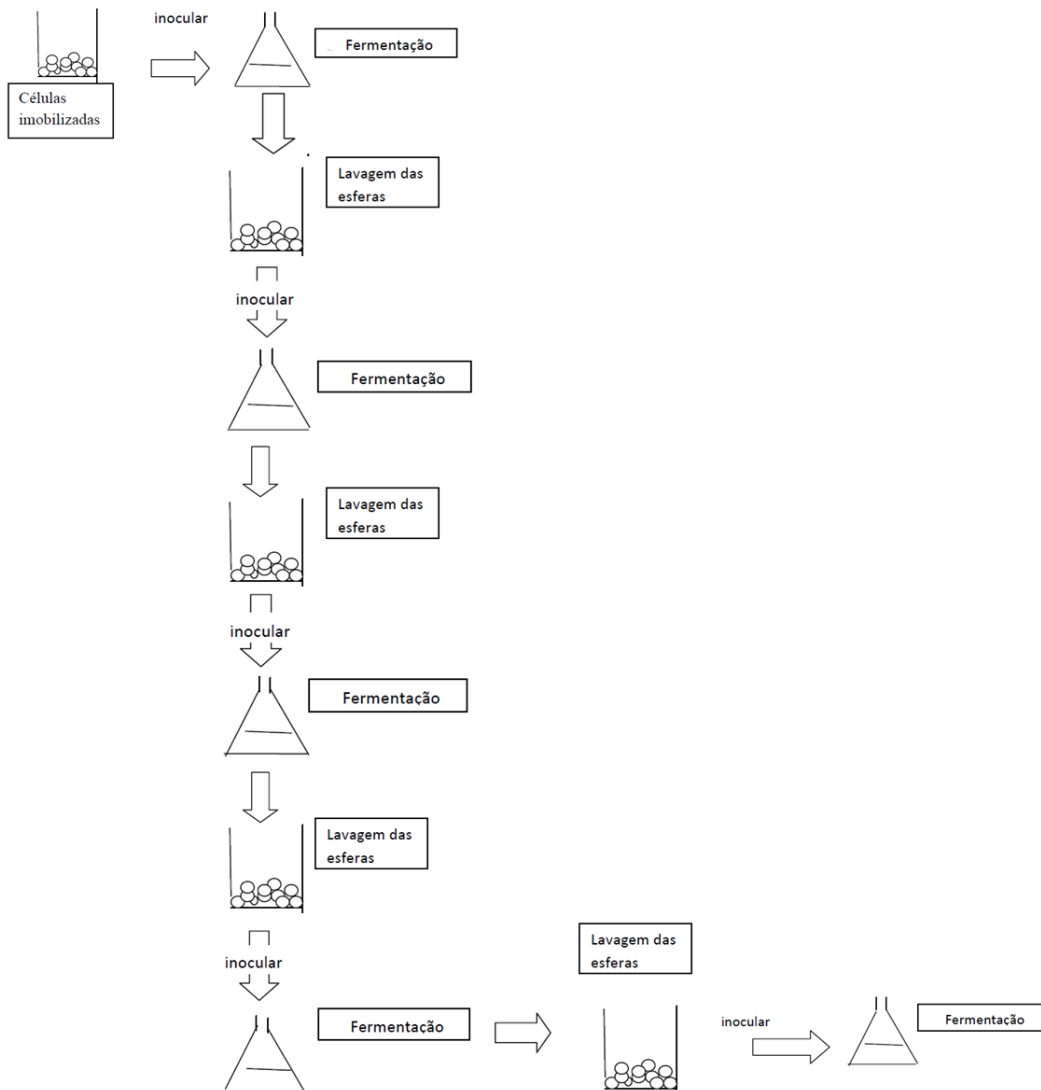


Figura 11: Esquema das fermentações sucessivas.

No fim das cinco fermentações determinou-se o número de células viáveis no interior das esferas com a 2% e 4% de alginato. Verificou-se que com 2% de alginato continham $4,65 \times 10^8$ CFU/g esferas, enquanto que as esferas de 4% continham $1,98 \times 10^8$ CFU/g esferas, ou seja a concentração de alginato não influenciou o número de células viáveis no interior das esferas.

No entanto, as duas concentrações de alginato utilizadas neste trabalho podem influenciar a estabilidade mecânica das esferas. De facto, a estabilidade depende não só das propriedades viscoelásticas e da concentração da solução de alginato de sódio, mas também do número de células imobilizadas (Kostov *et al.*, 2010). Para identificar possíveis alterações na estrutura das esferas durante a sua reutilização, estas foram analisadas visualmente imediatamente após a imobilização e no final das reutilizações

(Fig. 12) As esferas de ambas as concentrações de alginato apresentaram no final modificações estruturais, as quais foram mais evidentes nas esferas a 2% de alginato. Observa-se que a maioria se encontram deformadas e abertas, enquanto as esferas com concentração de 4% alginato no final das fermentações apresentam apenas pequenas fissuras na sua superfície.

Estes resultados mostram que as esferas obtidas com 4% de alginato são mecanicamente mais estáveis, permitindo um maior número de reutilizações, tornando assim o processo mais económico.



Figura 12: Esferas de alginato a 2% e 4% com *S. cerevisiae* imobilizada A- início do processo de imobilização B- Após 5 reutilizações.

3.2.1 Performance da fermentação durante as diferentes reutilizações de células imobilizadas

O mosto utilizado nas diferentes fermentações foi preparado de forma a obter no final da fermentação um teor alcoólico de 12%, conforme descrito no material e métodos.

Após cada preparação do mosto determinaram-se as suas características físico-químicas tais como: pH, °Brix, acidez total, azoto assimilável e açúcares redutores. Os valores obtidos encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Análise físico-química ao mosto-mel.

Fermentação	pH	°Brix	Acidez total (g/L ac.tartárico)	Azoto assimilável (mg/L)	Açúcares redutores (g/L)	
Células livres	3,71 ± 0,01	23,00 ± 0,01	1,33 ± 0,09	154,00 ± 7,00	221,38 ± 16,99	
1 ^a	3,83 ± 0,01	24,50 ± 0,01	1,58 ± 0,01	212,33 ± 10,69	274,21 ± 23,28	
2 ^a	3,82 ± 0,01	24,27 ± 0,12	1,55 ± 0,04	238,00 ± 7,00	246,16 ± 8,59	
Células imobilizadas	3 ^a	3,83 ± 0,01	23,53 ± 0,12	1,25 ± 0,04	242,67 ± 4,04	252,14 ± 22,06
4 ^a	3,83 ± 0,01	24,40 ± 0,20	1,35 ± 0,11	259,00 ± 0,01	230,49 ± 8,22	
5 ^a	3,83 ± 0,01	24,53 ± 0,12	1,45 ± 0,04	289,33 ± 17,62	245,33 ± 10,16	

Neste trabalho foram efetuadas repetições independentes pelo que, apesar de todos os esforços de tentar obter um mosto uniforme para todas as fermentações, verificaram-se pequenas diferenças em quase todos os parâmetros analisados tal como se pode verificar na Tabela 3. Este facto pode prender-se principalmente com a dificuldade de obter o mesmo mel pois trata-se de um mel de segunda categoria.

O problema mais comum que pode ocorrer durante a fermentação alcoólica utilizando células de levedura imobilizadas em esferas de alginato de cálcio é a libertação de células do interior da esfera para o meio de fermentação, devido à desagregação do gel. A rutura das esferas pode ocorrer devido ao crescimento celular, à formação e à acumulação de CO₂ (Drichoutis 2007; Liuni, 2008, Vilela *et al.*, 2012), à presença de agentes quelantes e à presença de iões não gelificantes, nomeadamente

Mg²⁺, Na⁺ ou K⁺, que substituem os íons de cálcio no gel de alginato (Smidsrød, 1990; Drichoutis, 2007; Vilela *et al.*, 2012). Da análise da figura 13, verifica-se que em todas as fermentações utilizando células imobilizadas com a 2% e 4% de alginato ocorreu libertação de células das esferas para o mosto. Apesar das esferas de alginato a 4% serem mecanicamente mais resistentes e apresentarem menos alterações ao fim das 5 reutilizações (Fig. 12), não impediram a saída de células para o meio.

Na primeira utilização das esferas de alginato a 2% e a 4%, detetou-se células no meio de fermentação 24 h após o início, enquanto que na segunda reutilização e nas reutilizações subsequentes observou-se a presença de células logo no tempo zero. Estes resultados indicam que o mosto preparado á base de mel interfere na estabilidade das esferas de alginato logo na primeira fermentação e que a integridade das esferas se vai deteriorando progressivamente nas seguintes fermentações. De acordo com Mendes-Faia e Côrte-Real, 2012, as alterações na integridade das esferas devem ser visualizadas ao longo da 1ª fermentação e subsequentes fermentações e não apenas ao fim do processo. Os nossos resultados são também corroborados pelas observações de Vilela *et al.* (2012). Segundo estes autores a integridade das esferas de alginato-quitosano depende do pH do mosto, para valores de pH igual ou superior a 3,5, as esferas de alginato-quitosano perderam a integridade.

No futuro seria aconselhável realizar estudos adicionais utilizando outros materiais na imobilização das células e avaliar o pH e outras variáveis do mosto na integridade das esferas.

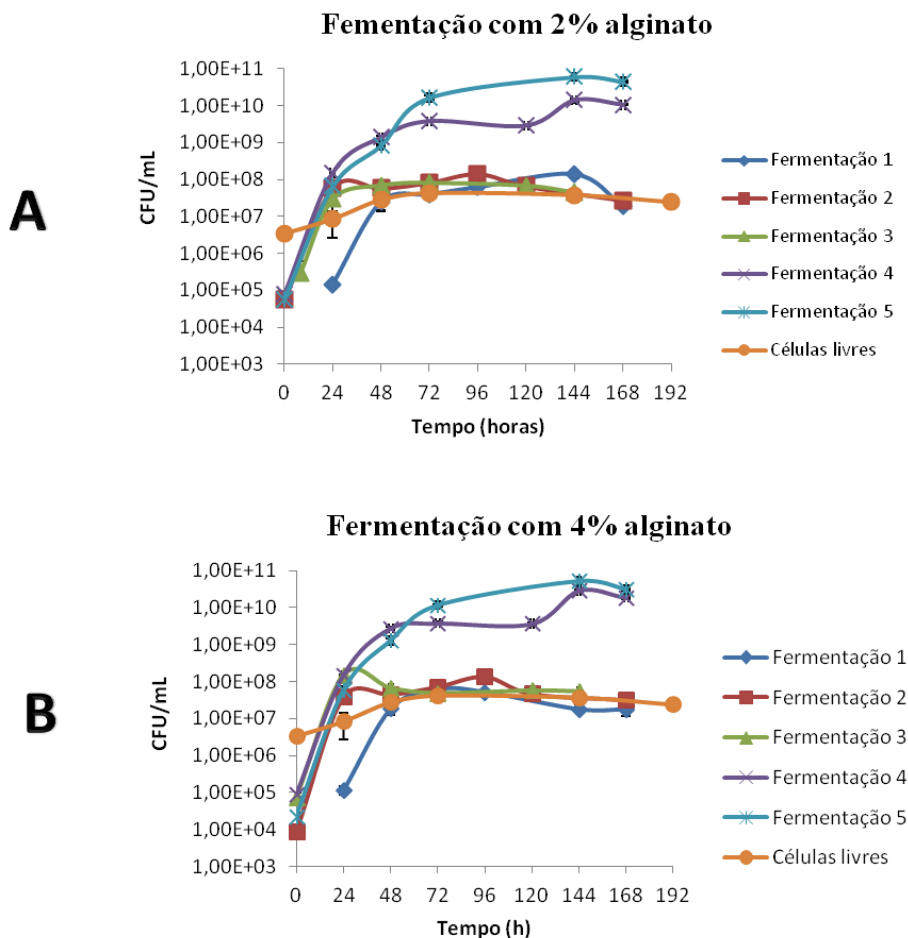


Figura 13: Variação da viabilidade das células *S. cerevisiae* livres em função do tempo.

A - fermentações com 2% de alginato. B- fermentações com 4% de alginato.

De modo a avaliar a estabilidade das esferas com 2% e 4% em alginato durante as sucessivas reutilizações na produção de hidromel, quantificou-se o crescimento de células livres *S. cerevisiae*, isto é, células resultantes da rutura das esferas ao longo da fermentação, através da biomassa por espectrofotometria e da viabilidade celular. O rendimento final de cada fermentação, ou seja a quantidade de etanol produzido por grama de açúcar consumido. Convém salientar que a concentração celular dentro das esferas apenas foi determinada no fim da quinta reutilização.

No que diz respeito à taxa específica de crescimento de *S. cerevisiae* verificaram-se diferenças significativas entre a primeira reutilização e as restantes, tanto nas células imobilizadas com 2% como com 4% de alginato. Este facto, poderá estar relacionado com a adaptação ao mosto e às condições de crescimento nas esferas de alginato. O crescimento de células livres não foi significativamente diferente do obtido nas reutilizações 3, 4 e 5. A biomassa final foi idêntica nas células livres e nas primeiras três

reutilizações. Nas fermentações conduzidas com células reutilizadas 4 e 5 vezes observou-se um aumento significativo da biomassa final verificando-se diferenças entre a concentração de alginato 2% e 4% (Tab. 4 e Fig. 13). A fase estacionária da fermentação levada a cabo com células livres teve início às 72 horas, na primeira fermentação com células imobilizadas iniciou-se às 48 horas, nas restantes fermentações às 24 horas. No entanto, nestas fermentações a fase estacionária teve início após as 48h enquanto que na fermentação com células livres teve início às 72h. Nas fermentações realizadas com as esferas de alginato reutilizadas pela 2ª e 3ª vez verificou-se que a taxa específica de crescimento aumentou sucessivamente e a fase estacionária iniciou-se logo após as 24h. Contudo, nas fermentações realizadas com as esferas de alginato reutilizadas pela 4ª e 5ª vez a taxa específica de crescimento diminuiu comparativamente às duas fermentações anteriores e alcançando valores similares ao crescimento das células livres. Nestas fermentações a fase estacionária também teve início após as 48h.

Tabela 4: Taxa específica de crescimento, biomassa final das células livres e rendimento em etanol para as diferentes fermentações.

Fermentação	μc (h⁻¹)	BF (CFU/ml)	Y_{etanol/açúcares} (%)
Células livres	0,15 ± 0,006 c	2,42×10 ⁷ ± 4,91×10 ⁶ a	57,67 ± 4,38 a
Células imobilizadas a 2% alginato	1 ^a	0,11 ± 0,04 b	1,83×10 ⁷ ± 2,08×10 ⁶ a
	2 ^a	0,18 ± 0,01 def	2,70×10 ⁷ ± 1,41×10 ⁶ a
	3 ^a	0,19 ± 0,0004 fg	4,45×10 ⁷ ± 7,07×10 ⁵ a
	4 ^a	0,15 ± 0,0002 cd	1,04×10 ¹⁰ ± 2,83×10 ⁸ b
	5 ^a	0,16 ± 0,006 cde	4,45×10 ¹⁰ ± 2,12×10 ⁹ e
Células imobilizadas a 4% alginato	1 ^a	0,08 ± 0,006 a	1,75×10 ⁷ ± 5,71×10 ⁶ a
	2 ^a	0,19 ± 0,004 fg	3,23×10 ⁷ ± 3,51×10 ⁶ a
	3 ^a	0,21 ± 0,02 g	5,40×10 ⁷ ± 3,46×10 ⁶ a
	4 ^a	0,17 ± 0,007 cde	1,84×10 ¹⁰ ± 1,06×10 ⁹ c
	5 ^a	0,15 ± 0,001 cd	3,10×10 ¹⁰ ± 2,65×10 ⁹ d

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

Em relação aos açúcares consumidos, os valores obtidos em ambos os ensaios (células imobilizadas com 2% e 4% de alginato) foram idênticos (Fig. 14).

Analisando a figura 14, verificamos que nas fermentações e conduzidas com células livres e com células após imobilização (1ª reutilização), com 2% e 4% de alginato o consumo dos açúcares ocorreu até as 96 horas, nas restantes fermentações o perfil de consumo de açúcares foi idêntico, sendo que, estes foram consumidos até as 72 horas. Segundo Duran (1986) a imobilização aumenta a atividade fermentativa da levedura, promovendo a adaptação das células ao meio e eliminando a fase *lag* nas fermentações sucessivas.

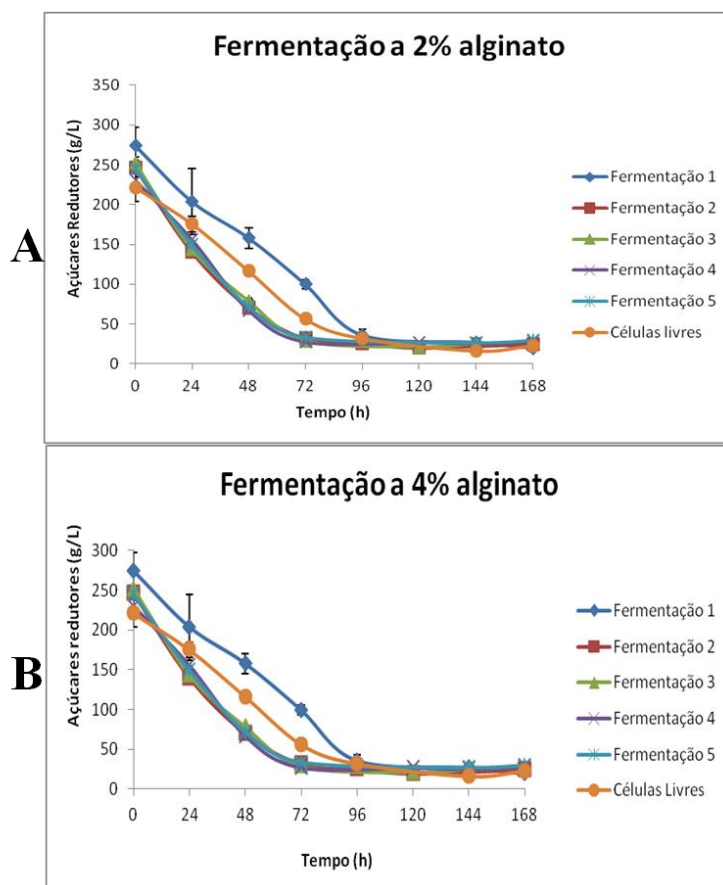


Figura 14: Variação dos açúcares redutores ao longo do tempo. A - fermentações com 2% de alginato. B- fermentações com 4% de alginato.

Bezbradica *et al.* (2007) na produção de cerveja, observou um aumento da taxa da fermentação de células *S. cerevisiae* imobilizadas em álcool polivinil, obtendo 10^9 células/ml, e conseqüentemente a diminuição da duração da fermentação. A

imobilização em álcool polivinil apresentou uma elevada estabilidade mecânica, visto que suportou trinta dias de fermentação sem alterar a atividade celular e o rendimento do processo.

A análise dos nossos resultados sugere que as fermentações com células imobilizadas são mais eficaz que as das células livres. No entanto, é necessário efetuar a imobilização das células em novas matrizes mecanicamente mais estáveis, uma vez que a imobilização com alginato de cálcio, permitiu a saída de células para o meio, No caso da produção do hidromel esta é uma característica indesejável na clarificação do produto final.

3.2.2 Caracterização físico-química do produto final

Como se verificou no ponto anterior a reutilização das células imobilizadas com 2% e 4% de alginato não afetou o rendimento em etanol nas diferentes fermentações. Para avaliar a qualidade do hidromel produzido com células livres e imobilizadas após sucessivas utilizações quantificaram-se os produtos da fermentação, nomeadamente o pH, a acidez volátil, acidez total, azoto assimilável, SO₂ total, teor alcoólico e açúcares redutores finais. Na Tabela 5 apresentam-se os resultados obtidos nas fermentações com células livres e imobilizadas com 2% e 4% de alginato.

Da análise tabela 5, não se verificaram diferenças significativas nos valores de pH entre as células livres e as células imobilizadas tanto a 2 e a 4% de alginato. De acordo com Sroka e Tuszyński (2007) nos primeiros dias de fermentação do mosto são produzidos dois ácidos principais, o ácido acético e o succínico, que são responsáveis pela diminuição do pH.

A acidez volátil, expressa em g/L de ácido acético, pode conferir, acima de certos valores, um sabor ou aroma desagradável a vinagre, o que torna a bebida imprópria para consumo implicando importantes perdas económicas para o produtor. A formação do ácido acético pode ocorrer em qualquer etapa da fermentação alcoólica. A Tabela 5 representa os valores obtidos na produção de ácido acético, tanto na fermentação realizada com células livres como com células imobilizadas. Da análise da Tabela 5 verificou-se que este parâmetro que influencia a qualidade organolética do hidromel apesar de ligeiramente elevado em todas as fermentações não ultrapassou os limites estipulados por lei para vinho branco. O valor mais baixo obteve-se na fermentação com células livres (0,78g/L) e os valores mais elevados na segunda reutilização de células

tanto a 2% (1,08 g/L ác. acético) como a 4%, (1,02 g/L ác. acético). Apesar disto, não se verificaram diferenças significativas na acidez volátil entre as várias fermentações. Os valores obtidos neste trabalho foram superiores aos recomendados para *Saccharomyces cerevisiae* quando utilizada na produção de vinho branco em fermentações vínicas, que variam entre 0,25 e 0,5 g/L (Nikolaou *et al.*, 2006; Bely *et al.*, 2008) mas abaixo do limite legal (1,1 g/L) (Regulamento (CE) N° 1493/1999, Anexo VB-1b). Gomes (2010) ao produzir hidromel á escala piloto (20L) obteve valores similares. No entanto, para a mesma estirpe (ICV D47) mas com formulações de mosto diferentes da utilizada neste trabalho Pereira *et al.* (2013), obtiveram valores de acidez volátil mais baixos na produção de hidromel. Os resultados obtidos podem estar associados à composição do mosto-mel e ao *stress* que as leveduras estão sujeitas durante a fermentação do mosto constituído à base de mel.

Relativamente à acidez total, observou-se o mesmo comportamento, ou seja foi estatisticamente idêntica comparando as fermentações com células livres com as fermentações utilizando células imobilizadas, à exceção da segunda reutilização que apresenta um valor superior. Ou seja, a fermentação com células imobilizadas com 2% de alginato apresentou uma acidez de 5,36 g/L ac. tartárico e para a fermentação com células imobilizadas com 4% em alginato com 5,50 g/L ac. tartárico. Segundo o Reg. (CE) n° 491/2009, a acidez total nos vinhos tem de ser superior ou igual a 3,5 g/L ac. tartárico, assim, os valores obtidos para este parâmetro nas diferentes fermentações estão dentro do legislado.

O azoto assimilável nas fermentações sucessivas e para as diferentes concentrações em alginato, variaram entre 21,00 e 49,0 mg/L e não se verificaram diferenças significativas entre elas, à exceção da quinta reutilização que apresentou valores de 73,50mg/L e 77,00 mg/L para 2 e 4% de alginato, respetivamente. Convém salientar que as diferenças observadas podem resultar do facto do teor em azoto inicial do mel a partir do qual foi produzido hidromel não ter a mesma composição, pois tratava-se de um mel de segunda categoria. Estes resultados estão de acordo com as observações de Mendes-Ferreira *et al.* (2010). Também, estes autores verificaram a presença de azoto residual quando utilizaram duas estirpes de *S. cerevisiae*, e diferentes concentrações de inóculo inicial na produção de hidromel. A estimativa do teor de azoto residual pode ser o resultado da quantificação de azoto não assimilável pelas leveduras, em particular do aminoácido prolina. Na verdade, o método de formaldeído usado tem uma taxa de recuperação de apenas 23% para a prolina (Filipe Ribeiro e Mendes-Faia,

2007), e este aminoácido representa 50 a 85% do teor de azoto total do mel (Anklam, 1998). Convém salientar que este aminoácido não é utilizado pela *S. cerevisiae*.

A ausência de SO₂ total em fermentações vinárias é pouco frequente, pois as leveduras produzem este composto durante a fermentação o qual pode ser superior a 30mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Analisando a Tabela 5, verifica-se que o SO₂ diminuiu nas fermentações realizadas com células imobilizadas o que poderá dever-se, ao facto, da imobilização facilitar a adaptação das células e diminuir a acumulação de substâncias inibidoras, isto é, reduzir as condições de *stress*.

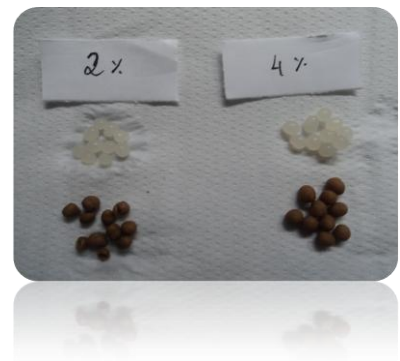
Tabela 5: Análises físico-químicas do hidromel

Fermentação	pH	Acidez volátil (g/L ác. acético)	Acidez total (g/L ac.tartárico)	Azoto assimilável (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Teor alcoólico (%)	Açúcares redutores (g/L)	
Células livres	3,35 ± 0,13 a	0,78 ± 0,03 a	4,25 ± 0,16 ab	32,67 ± 4,04 ab	39,25 ± 1,48 c	11,33 ± 0,12 a	24,02 ± 0,61 ab	
	1 ^a	3,63 ± 0,10 c	0,82 ± 0,03 ab	4,58 ± 0,08 b	21,00 ± 0,00 a	28,16 ± 0,00 b	12,03 ± 0,12 bc	21,08 ± 3,22 a
Células imobilizadas a 2% alginato	2 ^a	3,44 ± 0,02 abc	1,08 ± 0,00 f	5,36 ± 0,27 c	42,00 ± 0,00 bc	30,72 ± 0,00 b	11,80 ± 0,14 abc	24,97 ± 0,55 ab
	3 ^a	3,51 ± 0,16 abc	0,96 ± 0,00 de	4,58 ± 0,00 b	38,50 ± 4,95 bc	30,72 ± 0,00 b	11,80 ± 0,14 abc	24,77 ± 3,36 ab
	4 ^a	3,51 ± 0,02 abc	0,84 ± 0,08 abc	4,05 ± 0,32 a	42,00 ± 0,00 bc	30,72 ± 3,62 b	11,50 ± 0,28 ab	28,94 ± 0,60 b
	5 ^a	3,47 ± 0,01 abc	0,93 ± 0,04 bcde	4,39 ± 0,05 ab	73,50 ± 4,95 d	16,64 ± 1,81 a	11,55 ± 0,50 ab	29,34 ± 1,43 b
	1 ^a	3,61 ± 0,01 bc	0,86 ± 0,03 abcd	4,58 ± 0,08 b	23,33 ± 4,04 a	28,16 ± 0,00 b	12,10 ± 0,10 c	19,46 ± 2,40 a
Células imobilizadas a 4% alginato	2 ^a	3,37 ± 0,10 ab	1,02 ± 0,00 ef	5,50 ± 0,04 c	46,67 ± 4,04 bc	30,72 ± 2,56 b	11,97 ± 0,12 bc	24,58 ± 1,65 ab
	3 ^a	3,46 ± 0,04 abc	0,94 ± 0,03 cde	4,10 ± 0,04 a	42,00 ± 0,00 bc	30,72 ± 0,00 b	11,90 ± 0,00 bc	25,34 ± 0,71 ab
	4 ^a	3,48 ± 0,06 abc	0,92 ± 0,03 bcde	4,48 ± 0,11 ab	49,00 ± 7,00 c	31,57 ± 1,48 b	11,70 ± 0,00 abc	28,08 ± 2,33 b
	5 ^a	3,47 ± 0,04 abc	0,94 ± 0,03 cde	4,20 ± 0,15 ab	77,00 ± 7,00 d	16,21 ± 1,48 a	11,97 ± 0,12 bc	29,48 ± 0,40 b

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

CAPÍTULO 4:

Conclusão



4 Conclusão

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito de utilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato na produção de hidromel, utilizando mel de segunda categoria, bem como a influência da concentração de alginato na performance fermentativa. Também se estudou a possibilidade de reutilizar células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato em fermentações sucessivas.

Após as análises físico-químicas e polínicas ao mel de segunda categoria, utilizado na produção de hidromel, constatou-se que este mel de Trás-os-Montes, é um produto alimentar de boa qualidade, que cumpre todos os requisitos descritos no Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de Setembro, e como tal pode ser utilizado na produção de hidromel.

Relativamente à produção de hidromel os resultados obtidos indicam que é possível conduzir a fermentação alcoólica do mosto-mel utilizando leveduras imobilizadas em esferas com diferentes concentrações de alginato. Nas células imobilizadas com 2% e 4% de alginato a velocidade de consumo de substrato, a partir da primeira reutilização foi superior ao processo realizado com células livres, permitindo que a fermentação terminasse 24h ou 48h mais cedo. Verificou-se também que o consumo de açúcares nas diferentes reutilizações de células imobilizadas e nas células livres apresentou um perfil semelhante, apesar de, na segunda e restantes reutilizações o consumo terminar as 72 horas e, na primeira reutilização e no ensaio com células livres terminar às 96 horas.

A imobilização de células não influenciou de forma significativa alguns parâmetros enológicos como o rendimento dos açúcares consumidos/etanol, o teor alcoólico, o pH e a acidez total. Relativamente à acidez volátil, apesar de se ter verificado um ligeiro aumento, o valor obtido foi inferior ao limite legal (1,2 g/L) para o vinho branco. Verificou-se uma diminuição da produção de SO₂.

A concentração de alginato (2 e 4%) não influenciou significativamente quer os parâmetros utilizados para monitorizar o processo fermentativo quer as características do hidromel. Quanto á estabilidade mecânica das esferas, verificou-se que as de 4% de alginato foram mecanicamente mais estáveis, permitindo um maior número de reutilizações, tornando o processo mais económico.

Para as duas concentrações de alginato o número de células aumentou da primeira à quarta reutilização, enquanto entre a quarta e a quinta não se verificaram diferenças, indicando que a matriz utilizada para a imobilização não é a mais adequada para a produção de hidromel.

CAPÍTULO 5:
Referências
Bibliográficas

5 Referências bibliográficas

- Abu-Jdayil, B.; Ghzawi, A.A.; Al-Malah, K. I. M.; Zaitoun, S. (2002). Heat effect on rheology of light-and dark-colored honey. *Journal of Food Engineering*, **51**, 33-38.
- Abu-Tarboush, H.M.; Al-Kahtani, H. A; El-Sarrage, M.S. (1993), Floral-type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chemistry*, **26**, 17-33.
- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B., (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, **101**, 695–703.
- Aerny, J. (1996). Composés azotes des moûts et des vins. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **28**, 161–165.
- Al, M.L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S., (2009). Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, **112**, 863-867.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., Al-Habori, M., (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M., (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **3**, 15–23.
- Anklam, E., (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **63** (4), 549–562.
- Anónimos, 1986. Métodos oficiales de análisis para la miel. Orden de 12 de Junio de 1986 de la Presidencia del Gobierno, “Boletín Oficial del Estado” nº 145 de 18 de Junio de 1986. XXIII – Edulcorantes naturales y derivados.

- Arlete Mendes-Faia e Manuela Côrte-Real, *Enologia*, outubro/novembro/dezembro 2012.
- Aroucha E. M. M.; Oliveira A. J. F.; Nunes, G. H. S.; Maracajá P. B.;(2004). Qualidade do mel de abelha produzidos pelos Incubados da iagram e comercializado no Município de Mossoró/RN. *Caatinga, Mossoró*, **21**, n.1, 211-217.
- Arráez-Román, D., GómezCaravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carratero, A., Fernández-Gutiérrez, A., (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1648-1656.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., Souza, S.R., Dutra, V.M.L., (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249-254.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V., (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, **101**, 502-514.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T., (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, **105**, 822-828.
- Bezbradica, D.; Obradovic, B.; Leskosek-Cukalovic, I.; Bugarski, B.; Nedovic, V., (2007). Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 1348-1351.
- Bianchi, E.M., (1990). Control de calidad de la miel y la cera, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y alimentación (FAO).
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C., (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, **28**, 1-59.

- Bogdanov, S., Ruoh, K., Oddo, L.P. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, **35**, S4-S17.
- Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.
- Carillo Magana, F.A. (1998). Meliponicultura: el mundo de las abejas nativas de Yucatán. Mérida, México.
- Carvalho, W.; Canilha, L.; Silva, S.S. (2006). Uso de Biocatalizadores Imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica* - N°23.
- Castro-Vasquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S., (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, **112**, 1022-1030
- Champagne, C. P.; Gaudy, C.; Poncelet, D.; Neufeld, A. (1992). *Lactococcus Lactis* Release from Calcium Alginate Beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 1429-1434.
- Cherbuliez, T., Domerego, R., (2003). L'apithérapie, médecine dès abeilles. *Edition Amyris*, p. 255
- Ciani, M.; Ferraro, L. (1996). Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 128-132.
- Coelho, T.C. (2007). Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa Cylindrica*) visando a produção de xilitol. Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

- Covizzi, L.G.; Giese, E.C.; Gomes, E.; Dekker, R.F.H.; Silva, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, **28**, 2, 143-160.
- Cuevas-Glory, L., Pino, J., Santiago, L., Sauri-Duch, E., (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Journal Food Chemistry*, **103**, 1032-1043.
- Curvelo-Garcia A. S. 1988. Controlo de qualidade dos vinhos. Química Enológica e Métodos Analíticos. Instituto da Vinha e do Vinho.
- de Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A., Rodríguez, B., (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499-502.
- Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República Iª Série A.
- Divies, C.; Cachon, R.; (2005). Wine Production by immobilized cell systems. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, 285-293.
- Drichoutis, P.; Nerantzes, E.T.; Liouni, M., (2007). Continuous production of wine in a tower fermentor using entrapped yeast cells in double layer alginate-chitosan beads. *e-Journal of Science & Technology*.
- Duran PM, Baley JE (2008). Effects of immobilization on growth, fermentations properties and macromolecular composition of *S. cerevisiae* attached to gelatin, *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 73-87.
- Duran PM, Baley JE. Effects of immobilization on growth, fermentations properties and macromolecular composition of *S. cerevisiae* attached to gelatin, *Biotechnology and Bioengineering* **28**, 73-87.
- Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., and Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chem.* **112**, 329–338.

- Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., Zappalà, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation Quality Assurance*, **11**, 49-54.
- Filipe-Ribeiro, L.; Mendes-Faia, A. (2007). Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*, **100**, 1272-1277.
- Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M., (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**, 1649-1653.
- Genisheva, Z.; Macedo, S.; Mussatto, S.I.; Teixeira, J. A.; Oliveira, J.M. (2012). Production of White Wine by *Sacchomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *Journal of the Institute of Brewing*, **118**, 163-173.
- Gomes, T., (2010). Produção de hidromel: efeitos das condições de fermentação. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança.
- Groboillot, A.; Boardi, D.K.; Poncelet, D.; Neufeld, R.J. (1994) Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 75-107.
- Göksungur, Y.; Zorlu, N. (2001). Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. *Turkish Journal of Biology*, **25**, 265-275.
- Hernández, R. M.; Orive, G.; Murua, A.; Pedraz, J. L. (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery*, **62**, 711-730.
- Inal, M.; Yiğitoğlu, M. (2011). Production of bioethanol by immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* onto modified sodium alginate gel. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, **86**, 1548-1554.
- International Honey Commission (2002)

- Iurlina, M.O., Fritz, R., (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 297-304.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., del Olmo, M., (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A Molecular Study. *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 698-708.
- Kostov, G.; Angelov, M.; Mihaylov, I.; Poncelet, D: (2010). Mechanical properties of Ca-alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast. *Revue de Genie Industriel*, **5**, 25-35.
- Küçük, M., Kolailı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526-534.
- Liouni, M.; Drichoutis, P.; Nerantzis, E. T., (2008). Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate-chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, **24**, 281-288.
- Louveaux, J., Maurizio, A., G. Vorwohl, (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, **59**, 4, 139-157
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A., Pereira, J.O.B., (2003). Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, **39**, 19-23.
- Maia, M.; Russo-Almeida, P.; Pereira, J. O.; (2005). Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal). *Silva Lusitana*, **13** (1), 95-103.
- McConnell, D. S. and Schramm, K. D., (1995). Mead success: Ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring* **4**, 33-39.

- Mendes, C.G., Silva, J.B.A. da, Mesquita, L.X., Maracajá, P.B. (2009). As análises de mel: Revisão. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). *Revista Caatinga*, **22** (2), 07-12.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., and Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 193–198.
- Miller, G. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Najafpour, G.; Younesi, H.; Ismail, K. S. K., (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bioresource Technology*, **92**, 251-260.
- Navrátil, M., Sturdi'k, E., and Gemeiner, P., (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*. **23**, 977–982.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, **23**, 205-211.
- Nikolić, S.; Mojović, L.; Rakin, M.; Pejn, D.; Nedović, V., (2008). Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, **84**, 497-503.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O., (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, **7**, 159-165.
- Oliveira, M.A. (2011). Produção de cerveja de baixo teor alcoólico utilizando leveduras imobilizadas em biopolímero. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes.

- Organisation International de la Vigne e du Vin, (1990). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV, Paris.
- Organisation International de la Vigne e du Vin, (2006). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. OIV, Paris.
- Pereira A.P, Mendes Ferreira. A; Oliveira. J.M., Estevinho. L.M., Mendes-Faia. A., (2013). High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of. *Food Microbiology*, 114-123.
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., and Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*,. **47**, 2057–2063.
- Pilkington, P. H.; Margaritis, A.; Mensour, N. A.; Russel, (1998). I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, **104**, 19-31.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (2000). Handbook of Enology. In: The Microbiology of Wine and Vinifications, vol. 1. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Roldán, A., van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., and Caro, I., (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*. **126**, 574–582.
- Russo-Almeida, P.A., Paiva, J., (1996). Análise polínica do mel da Terra Quente Transmontana. *O Apicultor*, **13**, 33-42.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J., (1991). Mieles del Pais Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *Anales de Bromatologia*, **4**, 311-324.

- Sarrouh, B.F. (2009). Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: Avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica. Tese de Doutorado da Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP.
- Silva, C. L. da; Queiroz, A. J. de M.; Figueiredo, R. M. F. de. (2004). Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **8**, n.2/3, 260-265.
- Silva, E. M.S.da; Beserra, E. M. F., (2001). Análise físico-química de méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*, Paraíba.
- Smidsrød O, Skjåk-Bræk G, (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* **8**: 71-78.
- Sodré, G.S., Marchini, L.C., Moreti, A.C.C.C., Otsuk, I.P., Carvalho, C.A.L., (2007). Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, **37** (4), 1139-1144.
- Souza, D.C.; Bazlen, K. Análises preliminares de características físico-químicas de méis de Tiúba (*Melipona compressipes*) do Piauí. In: *XII Congresso Brasileiro de Apicultura*, Salvador, BA, 267.
- Sroka, P. and Tuszynski, T. 2007. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, **104**, 1250–1257.
- Ukpabi, U. J. (2006). Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical Subtropical Agroecosystem*, **6**, 37–41.
- Valbuena, A. O. (1992). Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria. Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

- Vargas, T. (2006). Avaliação da qualidade do mel produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.
- Vilela, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Côrte-Real, M. (2013). Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Vilela, A; Schuller, D.M; Mendes-Faia, A; Côrte-Real, M. (2012). Redução da acidez volátil de vinhos por células de *Saccharomyces Cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato-quitosano. *Enologia*.
- Wang, S.; Song, C.; Chen, G.; Guo, T.; Liu, J.; Zhang, B.; Takeuchi, S.; (2005). Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) / organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. *Polymer Degradation and Stability*; 87: 69.
- Wintersteen, C. L., Andrae, L. M., and Engeseth, N. J. (2005). Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of Food Science*, **70**, 119–126.
- Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I., (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, **41**, 952-956.

CAPÍTULO 6:

Anexos

6 Anexos

6.1 Anexo I: Reagentes utilizadas para a caracterização físico-química e polínica do mel

✓ **Solução alcoólica de fenolftaleína**

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

✓ **Solução de Carrez I**

Dissolver 15 g de ferrocianeto de potássio trihidratado em água destilada e perfazer o volume até 100 mL.

✓ **Solução de Carrez II**

Dissolver 30 g de acetato de zinco dihidratado em água destilada e perfazer o volume até 100 mL.

✓ **Solução de bissulfito de sódio a 0.2% (validade de 24 horas)**

Num balão de 100 ml, pipetar 0,38 ml de bissulfito de sódio e perfazer o volume com água destilada.

✓ **Solução tampão acetato pH 5,3**

Dissolver 87 g de acetato de sódio trihidratado em 400 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 10,5 mL de ácido acético glacial (4,4) e perfazer com água destilada até 500 mL. Ajustar o pH, se necessário, com acetato de sódio ou ácido acético.

✓ **Solução stock de iodo**

Dissolver 22 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada. Adicionar 8,8 g de iodo (p.a.), dissolver e perfazer o volume de 1 L com água destilada.

✓ **Solução de iodo 0,0007 N (solução com validade de 48 horas)**

Dissolver 20 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 5 mL de solução stock de iodo e perfazer o volume até 500 mL com água destilada.

✓ **Solução de iodo 0,02 N (solução diária)**

Dissolver 20 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 143 mL de solução stock de iodo e perfazer o volume até 500 mL com água destilada.

✓ **Solução de cloreto de sódio 0,5M**

Dissolver 14,5 g de cloreto de sódio (p.a.) em água destilada e completar até 500 mL.

✓ **Solução de amido (o índice de azul tem que estar compreendido entre 0,5 e 0,55)**

Dissolver 1 g de amido anidro em 45 mL de água destilada, num copo de 50 mL. Levar rapidamente à ebulição, agitando sempre, durante 3 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente. Adicionar 2,5 ml de tampão acetato pH 3,5. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL, colocar em banho-maria a 40°C, e perfazer o volume com água destilada.

Num balão volumétrico de 100 mL, colocar 75 mL de água destilada, 1 mL de ácido clorídrico 1 N, 1,5 mL de solução de iodo 0,02 N, adicionar 0,5 mL de cozimento de amido e perfazer o volume de 100 mL com água destilada. Deixar repousar durante 1 hora no escuro e ler a absorvância a 660 nm. Usar como branco, uma solução de composição idêntica excepto cozimento de amido. O valor de absorvância é igual ao valor de índice de azul, e para valores não compreendidos entre 0,5 e 0,55, é necessário ajustar a massa de amido anidro pesada.

✓ **Solução de Fehling A**

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

✓ **Solução de Fehling B**

Dissolver 346 g de tartarato de sódio potássio tetrahidratado e 100 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada, perfazer o volume até 1 L e filtrar.

✓ **Solução de azul-de-metileno (0.2%)**

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

✓ **Glicerogelatina**

Pesar 7 g de folhas de gelatina, cortadas em pedaços pequenos, colocar num copo de 100 mL e adicionar 42 mL de água destilada. Deixar repousar durante 2 horas. Adicionar à gelatina, agitando sempre, 50 g de glicerina concentrada e 0,5 g de fenol. Aquecer a mistura durante 15 minutos e adicionar umas gotas de fucsina básica. Filtrar a solução através de lã de vidro e recolher o filtrado para uma placa de Petri.

Solução corante de fucsina básica

Dissolver 0,5 g de fucsina básica em 1 mL de etanol 70%, e perfazer o volume de 150 mL com água destilada

6.2 Anexo II: Reagentes utilizadas para a produção de hidromel

✓ Meio YPD sólido

20 g Agar;

10 g Peptona;

5 g Extrato de leveduras;

20 g Glucose;

1 L Água destilada.

Dissolver todos os componentes num litro de água e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

✓ DNS

Dissolver 2g de DNS em 40 mL de NaOH 2M a 80°C. Simultaneamente dilui-se 60g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle) em 100 mL de água destilada. Após dissolução completa, misturar duas soluções e perfazer o volume de 200 mL de água destilada. A solução é conservada num frasco e local escuro.

✓ Azul de bromotimol 0, 4%

Dissolver 4g de azul de bromotimol em 200 cm³ de álcool. Juntar 200 cm³ de água destilada sem CO₂ e NaOH 1N até ficar azul. Perfazer até 1 L com água destilada.

✓ Solução de NaOH a 1N

Dissolver 40g de NaOH em água destilada e perfazer o volume até 1000 mL

✓ Solução de NaOH a 0,1N

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

✓ Solução de NaOH a 0,05N

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

✓ Solução de cozimento de amido a 1%

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

✓ **Solução de H₂SO₄ a 1/3**

Misturar 1 volume de H₂SO₄ para 2 volumes de água destilada.

✓ **Solução de iodo a 0,02N**

Preparar uma solução de iodo a 0,1N. Dissolver 2g de iodeto de potássio em 3-4 mL de água destilada. Pesar 1,27 g de iodo I₂ (reagent grade) e transferir para a solução de iodeto de potássio. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada.

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

✓ **Solução de fenolftaleína a 1%**

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