

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

RODRIGO CHRIST ZUCHELLO

**PRODUÇÃO DE VINAGRE *GOURMET* A BASE DE MIRTILO E MEL
DE ABELHAS MELIPONAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2016**

RODRIGO CHRIST ZUCHELLO

**PRODUÇÃO DE VINAGRE *GOURMET* A BASE DE MIRTILO E MEL
DE ABELHAS MELIPONAS**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Professor Orientador: Mário Antônio Alves Cunha;
Coorientadora: Vidianny Aparecida Queiroz Santos.

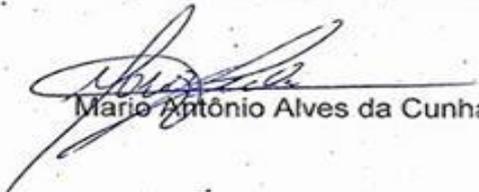
Pato Branco – PR

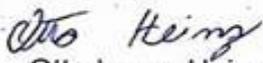
2016

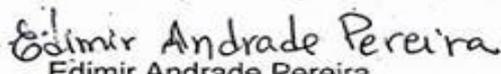
TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Produção de vinagre gourmet a base de mirtilo e mel de Abelhas Meliporas**, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 8.2.2016-B de 2016.

Fizeram parte da banca os professores.


Mario Antônio Alves da Cunha


Otto Lucas Heinz


Edimir Andrade Pereira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Claudir Zucchello. É engraçado mas eu nem havia nascido e já tinha um enxame de Jataí, sendo este o primeiro presente que ganhei de meu pai. Apaixonado por apicultura, sempre me levou junto em suas aventuras, eu digo aventura, mas ele fazia disso um hobby, árduo e cansativo que lhe trazia prazer e satisfação, um reflexo de sua alma, a qual cativava todos os espectadores, que presenciavam a realização do momento da colheita. Poucos saberão como era e como foi um dia, o contato direto com a natureza que tínhamos naquele tempo, em meio a mato fechado, algumas vezes era preciso fazer uso do facão para chegar as caixas de abelhas, bom, chegar era fácil... complicado era sair carregando 50 – 100 kg de mel. Recordo-me plenamente também, que muitas vezes tivemos que abandonar tudo e correr... na época os equipamentos eram escassos e a maioria ficava comigo. Dentre tantas aventuras pude colher mel, aprendizado, valores, conhecimento e amor. Hoje, revivo neste trabalho um pouco do que aprendi naquele tempo e aproveitando o embalo, também concluo aqui mais uma etapa de minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram e se envolveram neste trabalho.

Obrigado meus caros amigos Daniel Both e Antonio de Oliveira, em especial a Eloisa Pasquali, vocês foram principalmente meu apoio emocional.

Obrigado Michel Fonseca pelo apoio no laboratório.

Também aos demais colegas de classe Marcelão e Fabião, vai ficar na memória a nossa produção artesanal de hidromel que... só faltou fermentar.

Ao meu orientador e coorientadora Mário A. A. Cunha e Vidianny Ap. Q. Santos. Se o conhecimento é poder, então foram vocês quem me deram força!. Por um longo período fui apenas um mero acadêmico, uma rocha bruta, a qual foi lapidada aos poucos por vocês. Foram tantas as reuniões, encontros e conversas despretensiosas, que aos poucos foram me direcionando ao caminho da pesquisa. A busca pelo conhecimento é fascinante, mas saber lidar com ele é muito complicado. Aprendi a ler, ler e ler novamente, tanto fiz isto já na vida e ainda assim preciso melhorar. Mais uma vez obrigado a vocês. Ter conhecido e trabalhado com profissionais tão especiais como vocês foi sem dúvidas o grande diferencial de minha graduação.

Por fim e com todo meu amor agradeço a minha família, tios, primos e minha amável mãe Gladis, sem você eu jamais teria condições ou estrutura para seguir em frente, não apenas neste trabalho, mas sim em tudo que já fiz na vida, meu muito abrigado, te amo.

EPÍGRAFE

"Quanto maior o conhecimento,
menor o ego, quanto maior o
ego, menor o conhecimento."
(Albert Einstein)

RESUMO

ZUCHELLO, Rodrigo Christ. PRODUÇÃO DE VINAGRE *GOURMET* A BASE DE MIRTILO E MEL DE ABELHAS MELIPONAS. 2016. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

O mel de abelhas meliponas jataí (*Tetragonisca angustula*) e o mirtilo (*Vaccinium ashei*) são alimentos ainda pouco explorados comercialmente no Brasil. Possivelmente a baixa produtividade do mel e a falta de conhecimento do cultivo de mirtilo sejam fatores determinantes na produção dos mesmos. Tais alimentos possuem em sua composição apreciáveis conteúdos de compostos bioativos, responsáveis por potencialidades biológicas como ação antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica, os quais poderiam ser aproveitados pela indústria alimentícia. Diante disto, buscando a valorização de matérias-primas da região, o presente trabalho teve como objetivo o uso de mirtilo e mel de meliponas produzidos na região sudoeste do Paraná na produção de um vinagre do tipo *gourmet*. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos do mel, subseqüentemente os parâmetros fermentativos e oxidativos. O potencial antioxidante e teores de fenólicos totais, foram determinados para o mel, melomel e vinagre. A fermentação acética foi conduzida pelo processo lento (d'Orléans) em vinagreira de grábia. A biotransformação ácido-acética ocorreu ao longo de 15 dias em temperatura ambiente. No final do processo foi verificada produção média de 41,21 g/L de ácido acético. O produto apresentou acidez titulável de 4,04 g/100mL e apreciável conteúdo de fenólicos totais (47,62 mg GAE/100mL). O vinagre produzido também apresentou potencial antioxidante, o qual foi verificado pelos métodos de captura dos radicais livres DPPH* (46,53 µmol TE/100mL) e ABTS*+ (190,97 µmol TE/100mL) e poder redutor do íon férrico, FRAP (872,28 µmol de FeSO₄·7H₂O eq./100mL). A combinação de mirtilo e mel de meliponas para produção de vinagre do tipo *gourmet* pode ser uma boa opção para agregar valor as cadeias produtivas envolvidas no processo e contribuir para o desenvolvimento de propriedades rurais de base familiar.

Palavras-chave: Meliponicultura. Acetificação. Melomel. Vinagre *Gourmet*. *Saccharomyces cerevisiae*. Bactérias acéticas.

ABSTRACTS

ZUCCHELLO, Rodrigo Christ. PRODUCTION OF GOURMET VINEGAR BASED ON BLUEBERRY AND HONEY OF MELIPONINAE BEES. 2016. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Meliponinae (*Tetragonisca angustula*) bees honey and blueberry (*Vaccinium ashei*) foods are still little explored commercially in Brazil. Possibly the low productivity of the honey and the lack of knowledge about blueberry cultivation be the determinant factors in the production of these foods. Such foods have in their composition appreciable content of bioactive compounds, that are responsible for biological functionalities as antioxidant, antimicrobial, antiviral and anticarcinogenic properties, which could be exploited by the food industry. In this way, seeking to add value to raw materials of the region the present study aimed to use the blueberry and meliponinae honey produced in the southwest of Paraná in the production of a like *gourmet* vinegar. The physico-chemical parameters of the honey were analyzed, subsequent the fermentative and oxidative parameters. The antioxidant potential and total phenolic contents were determined for honey, melomel and vinegar. The acetic fermentation was conducted by the slow process (d'Orléans) in grape wood barrel. The acetic acid biotransformation took place over 15 days at room temperature. At the end of the process was verified an average production of 41.21 g/L acetic acid. The product presented titratable acidity of 4.04 g/100mL and appreciable content of total phenolics (47.62 mg GAE/100mL). The vinegar produced also showed high antioxidant potential, which was verified by the methods of capture of free radicals DPPH• (46.53 µmol TE/100mL) and ABTS•+ (190.97 µmol TE/100mL) and reducing power of ferric ion, FRAP (872.28 µmol de FeSO₄·7H₂O eq./100mL). The combination of blueberry and meliponinae honey to the production of like *gourmet* vinegar can be a good option to add value to the chains involved in the process and contribute to the development of family-based farms.

Keywords: Meliponiculture. Acetification. Melomel. Vinegar *Gourmet*. *Saccharomyces cerevisiae*. Acetic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Arquitetura da entrada do ninho de abelhas meliponas	16
Figura 2: Meliponário do viveiro municipal de plantas nativas da prefeitura municipal de João Pessoa- PB.....	17
Figura 3: Depósitos de excremento em melgueiras de urucu-nordestina, antes da produção de mel (esquerda), foto à direita mel produzido sobre os excrementos das abelhas.....	20
Figura 4: Abelha Jataí (<i>T. angustula</i>) e sua entrada de ninho.....	21
Figura 5: Fruto mirtilo (<i>Vaccinium ashei</i>).....	22
Figura 6: Atividade das leveduras em função do oxigênio disponível. Imagem representativa.....	24
Figura 7: Recipiente utilizado para elaboração de vinagre pelo processo Orleans. Imagem representativa.....	28
Figura 8: Polpa de mirtilo e mel utilizados no preparo do mosto.....	31
Figura 9: Fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).....	32
Figura 10: Inóculo (pé de cuba) em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).....	33
Figura 11: Fermentação alcoólica de mosto de mel de Jataí e mirtilo em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).....	34
Figura 12: Vinagreira de grábia do laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos da UTFPR, câmpus Pato Branco.	37
Figura 13: Teste de Lund (A), teste de Fiehe (B), teste de Lugol (C), respectivamente.....	52
Figura 14: Concentração de açúcares redutores totais (ART) e etanol ao longo da fermentação alcoólica.	53
Figura 15: Perfil do pH e acidez ao longo da fermentação alcoólica.....	55
Figura 16: Perfil da produção ácido acético e consumo de etanol ao longo da fermentação acética.....	57
Figura 17: Comportamento do pH e acidez durante a acetificação do melomel de mirtilo.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação por região das principais espécies de meliponíneos no Brasil:	19
Tabela 2: Valores médios dos parâmetros físico-químicos do mel de abelhas meliponas Jataí.	48
Tabela 3: Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos do mel de abelhas meliponas Jataí (<i>Tetragonisca angustula</i>).....	52
Tabela 4: Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.....	54
Tabela 5: Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do melomel (obtido a partir de mel de abelhas meliponas Jataí e frutos de mirtilo).....	56
Tabela 6: Parâmetros fermentativos avaliados no processo de acetificação.	59
Tabela 7: Atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais no vinagre produzido.	59
Tabela 8: Comparação dos teores de compostos fenólicos e antioxidantes antes e pós oxidação acética.....	60

LISTA DE SÍMBOLOS

$C_6H_{12}O_6$ – Glicose

CH_3CH_2OH – Etanol

CH_3COOH – Ácido Acético

CO_2 – Dióxido de carbono

O_2 – Gás Oxigênio

H_2O – Água

SO_2 – Dióxido de enxofre

$^{\circ}GL$ – Grau Gay-Lussac

$^{\circ}C$ – Grau Celsius

$Y_{P/S}$ – Rendimento em produto (g/g)

ΔP – variação da produção em etanol (g/L)

ΔS – consumo de substrato (g/L)

Q_P – produtividade volumétrica em etanol (g/L.h)

t_f – tempo da fermentação (h)

P – concentração final de etanol (g/L)

P_0 – concentração de etanol no instante inicial (g/L)

Q_S – velocidade de consumo do substrato (g/L.h)

S_0 – concentração de substrato inicial (g/L)

S – concentração final de substrato (g/L)

η – eficiência da fermentação alcoólica

% – Porcentagem

LISTA DE ABREVIATURAS

kg – Quilograma

mg – Miligrama

g – Grama

g/100g – Grama por cem gramas

v/v – Volume por volume

g/100mL – Grama por 100 mililitros

g/L – Grama por litro

mg/L – Miligrama por litro

mL – Mililitro

g/g – grama por grama

L – litro

nm – Nanômetro

µg – microgramas

S. – *Saccharomyces*

A. – *Acetobacter*

V. – *Vaccinium*

T. – *Tetragonisca*

A. – *Apis*

Y.P.D. – Extrato de levedura-peptona-dextrose

ATP – Adenosina trifosfato

ABTS – 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)

ART – Açúcares Redutores Totais

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

GAE – Equivalente Ácido Gálico

TE – Trolox equivalente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 MELIPONICULTURA	15
3.1.1 Mel de abelhas meliponas Jataí (<i>Tetragonisca angustula</i>).....	20
3.2 FRUTO DE MIRTILO.....	21
3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	22
3.3.1 Hidromel.....	24
3.3.2 Leveduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.4 OXIDAÇÃO ACÉTICA	26
3.4.1 Vinagre	28
3.4.2 Bactérias acéticas	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 MATERIAL	29
4.1.1 Mel.....	29
4.1.2 Mirtilo.....	30
4.1.3 Micro-organismos.....	30
4.1.4 Sais minerais e reagentes químicos.....	30
4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	30
4.2.1 Preparo do mosto para a fermentação alcoólica	30
4.2.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica	31
4.2.3 Descrição da fermentação alcoólica.....	32
4.2.4 Procedimento experimental da fermentação alcoólica	32
4.2.5 Cálculo do rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica...35	
4.3 OXIDAÇÃO ACÉTICA	36
4.3.1 Preparo do inóculo para a acétificação	36
4.3.2 Procedimento experimental da acetificação	37
4.3.3 Cálculo do rendimento e produtividade acetificação	38
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
4.4.1 Determinação de umidade	39

4.4.2	Determinação de resíduo mineral (cinzas)	40
4.4.3	Determinação de atividade de água	40
4.4.4	Determinação pH	40
4.4.5	Determinação de acidez total	41
4.4.6	Determinação de cor	41
4.4.7	Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)	41
4.4.8	Determinação de açúcares redutores totais por solução de Fehling	41
4.4.9	Determinação de sacarose aparente	42
4.4.10	Determinação de açúcares totais por DNS	43
4.4.11	Determinação de atividade diastásica	43
4.4.12	Determinação de Lund	44
4.4.13	Determinação de Fiehe	44
4.4.14	Determinação de Lugol	45
4.4.15	Determinação de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético	45
4.4.16	Compostos fenólicos	45
4.4.17	Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH*	46
4.4.18	Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS*	46
4.4.19	Determinação da atividade antioxidante utilizando ion férrico (FRAP)	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL	48
5.2	PARÂMETROS FERMENTATIVOS DO MELOMEL	53
5.3	PARÂMETROS FERMENTATIVOS DA OXIDAÇÃO	57
6.	CONCLUSÃO	61
7.	REFERENCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

Um dos produtos mais utilizados no mundo como condimento e conservante de alimentos é o vinagre, sendo considerado um importante complemento para a alimentação humana. Produzido via fermentação alcoólica e oxidação acética inicialmente os açúcares presentes na matéria são fermentados a etanol, o qual é posteriormente oxidado a ácido acético, sendo empregado em cada etapa microrganismos específicos.

A indústria brasileira ainda não atentou para o fato de que a produção de vinagres de qualidade, com propriedades nutricionais relevantes, pode conquistar um mercado seletivo de consumidores. Neste sentido, o desenvolvimento de novos produtos e a geração de dados que possam contribuir para a indústria brasileira pode ser de grande relevância.

Dentre os diversos tipos de vinagres com propriedades nutricionais e bioativas, destacam-se os vinagres de frutas e de mel. Na Europa, os vinagres produzidos a partir de mel têm ganhado mercado e conquistado um público atento para produtos alimentícios benéficos a saúde.

O mel pode ser considerado uma excelente matéria-prima para a produção de fermentados alcoólicos (vinhos) e acéticos (vinagres). Os produtos obtidos a partir de diferentes tipos de méis podem conter em sua composição substâncias com potencial antioxidante. O mel de abelhas meliponas Jataí (*Tetragonisca angustula*), comumente conhecidas como abelhas sem ferrão, apresentam propriedades distintas de sabor e qualidade nutricional. O fruto mirtilo (*Vaccinium ashei*), oriundo da família dos pequenos frutos como morango e acerola, por sua vez, também é um produto funcional rico em minerais, fibras, compostos fenólicos, antocianinas e apresenta propriedades antioxidantes, antissépticas e anti-inflamatórias. No entanto, no Brasil estas matérias-primas ainda são pouco exploradas tecnologicamente para a produção de derivados com maior valor agregado.

Vinagres de mel de abelhas meliponas e mirtilo podem ser produzidos de forma artesanal, e desta forma podem constituir uma importante estratégia de agregação de valor a propriedades familiares rurais, destacando-se aquelas situadas na região Sul do Brasil.

O presente projeto teve como principais objetivos a produção e caracterização de um vinagre do tipo *gourmet*, obtido a partir de mel de abelhas meliponas (*Tetragonisca angustula*) e mirtilo (*Vaccinium ashei*) por meio de processo lento (D'orleans).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de vinagre de mel de abelhas meliponas Jataí e mirtilo pelo processo lento de acetificação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o mel de abelhas meliponas Jataí através da avaliação de parâmetros físico-químicos.
- Produzir fermentado alcoólico (melomel) a partir do mel de abelhas meliponas Jataí e fruto mirtilo.
- Avaliar os parâmetros fermentativos do fermentado alcoólico (melomel).
- Produzir fermentado acético a partir do fermentado alcoólico (melomel) por meio de processo lento, conduzido em vinagreira de madeira grápia.
- Avaliar os parâmetros fermentativos da oxidação acética.
- Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais e avaliar o potencial de atividade antioxidante do mel, fermentado alcoólico e do vinagre produzido.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MELIPONICULTURA

No Brasil, abelhas mais conhecidas e empregadas na apicultura comercial são as da espécie *Apis mellifera*. No entanto, é bastante amplo o universo das abelhas. Entre as abelhas sociais, além da conhecida *A. mellifera*, estão as da tribo *Meliponini*, que agrupa vários gêneros de abelhas (LOPES et al., 2005). No Brasil,

os meliponíneos são representados por cerca de 300 espécies, sendo a maioria destes produtores de mel (CRUZ e CAMPOS, 2009; ALVES et al., 2005).

Os meliponíneos são conhecidos como “abelhas sem ferrão”, ou seja, incapazes de ferrear, pois apresentam um ferrão atrofiado. Os hábitos de nidificação, estrutura interna e arquitetura de entrada do ninho são características marcantes de cada gênero ou espécie, conforme demonstrado na Figura 1. Essas características comumente auxiliam na identificação e reconhecimento das mesmas (SILVA, 2012).



Figura 1: Arquitetura da entrada do ninho de abelhas meliponas
Fonte: Villas-Bôas (2012).

Os meliponíneos produzem produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, sendo os principais atrativos para a sua criação racional o mel, pólen, própolis e geoprópolis (SILVA, 2012). Contudo, ao discutir sobre produtos oriundos da meliponicultura é importante ressaltar que no Brasil não existe legislação específica que regulamenta a cadeia produtiva da meliponicultura. No que se refere aos produtos de abelhas, o Brasil dispõe apenas de legislação que ampara a apicultura, ou seja, a atividade produtiva associada à criação das estrangeiras *A. mellifera* (VILLAS-BÔAS, 2012). Importante ressaltar que os estados da Bahia e Rio

Grande do Sul, já possuem regulamentações aos méis de abelhas meliponas, bem como regulamentos aos produtores, uma vez que este mel é mais suscetível a deterioração que o mel das abelhas *A. mellifera*. Recentemente o estado do Paraná vem avaliando estudos descritos na literatura para regulamentação do produto (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2016).

Segundo Villas-Bôas (2012), o futuro da meliponicultura mundial é a polinização agrícola por estas abelhas, devido a características como sociabilidade, baixa defensibilidade, amplitude de voo e forrageamento e a perenidade das colônias. Tais características fazem deles os insetos sociais mais promissores para o uso racional como polinizadores comerciais (CRUZ e CAMPOS, 2009), destacando-se ainda por serem considerados espécies generalistas que exploram um amplo espectro floral ao longo do ano (SILVA, 2012). Como não apresentam ferrão, seu manejo é facilitado, dispensando o uso de equipamentos de proteção e possibilitando o emprego de mão de obra familiar (BOBANY et al., 2010). A Figura 2 demonstra que as colônias podem ficar próximas, sem o risco de conflito entre as mesmas.



Figura 2: Meliponário do viveiro municipal de plantas nativas da prefeitura municipal de João Pessoa- PB.
Fonte: Villas-Bôas (2012).

A importância dos meliponíneos vai muito além dos benefícios econômicos, oriundos dos seus produtos. A reconstituição de florestas tropicais e conservação dos remanescentes, estão diretamente ligadas a essas abelhas que tem papel fundamental nos processos ecológicos, além de atuarem com bioindicadores da qualidade ambiental (SILVA, 2012; CRUZ e CAMPOS, 2009). Porém, Cruz e

Campos (2009) comentam que, essas abelhas estão sob constante ameaça em função da destruição de seus habitats naturais, os quais são fontes de alimento e locais de nidificação.

Os meliponíneos produzem um tipo de mel diferente daquele produzido pela *A. mellifera*. Já a quantidade de mel produzida em relação a *A. mellifera* é muito baixa, por isso, os produtores de mel não se interessam pelo manejo da meliponicultura, o que explica a limitada oferta desse produto. Conseqüentemente, em algumas regiões como o Sudeste e Sul do Brasil, poucos conhecem os sabores do mel de suas abelhas nativas, o que faz desse produto uma verdadeira iguaria (LOPES et al., 2005).

Como há uma diversidade enorme de espécies de abelhas sem ferrão (Tabela 1), normalmente há muita confusão em relação aos nomes populares dos meliponíneos. Comumente isso acontece pelas variações linguísticas regionais, podendo até um mesmo nome representar mais de uma espécie diferente de abelha (SILVA, 2012).

Tabela 1: Representação por região das principais espécies de meliponíneos no Brasil:

Região	Nome Científico	Nome(s) Popular(es)	Estados
Norte	<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaíra, Jandaíra-Preta	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-Cinzenta,	PA, TO
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra-Amarela	AM, PA
	<i>Scaptotrigona</i> sp. ^{1,2}	Canudo ¹	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
Nordeste	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI
	<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AL, BA, PB, PE, SE
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu-Verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu	AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE
Centro-Oeste	<i>Melipona compressipes</i>	Uruçu, Jandaíra	GO, MS, MT
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	GO, MS, MT
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu	MT
	<i>Scaptotrigona</i> sp. ^{1,2}	Canudo ¹	GO, MS, MT
	<i>Tetragonisca angustula</i> ²	Jataí	GO, MS, MT
Sudeste	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	MG, SP
	<i>Tetragonisca angustula</i> ²	Jataí	ES, MG, RJ, SP
Sul	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	PR, RS, SC
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	PR, RS, SC
	<i>Melipona mondury</i>	Monduri	PR, RS, SC
	<i>Tetragonisca angustula</i> ²	Jataí	PR, RS, SC

1. Existem várias espécies do gênero *Scaptotrigona*, de diferentes regiões, chamadas "canudo" ou "tubiba".

2. Espécies da tribo Trigonini.

Fonte: Villas-Bôas (2012).

Como pode ser observado e Villas-Bôas (2012) comenta, as abelhas sem ferrão são extremamente dependentes do ambiente onde vivem, fato relacionado à íntima ligação com os recursos florais disponíveis em diferentes regiões e a climas específicos.

Quanto a qualidade do mel, esta varia entre as espécies e um dos fatores determinantes é referente aos hábitos “higiênicos” das espécies, onde algumas depositam seus excrementos na mesma área onde armazenam os potes de alimento. É o caso da uruçú-nordestina (*Melipona scutellaris*) (Figura 3). Por outro lado, existem espécies muito organizadas, que preparam melgueiras “limpas”. As abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*), jataí (*Tetragonisca angustula*) e tiúba (*Melipona fasciculata*) são bons exemplos de abelhas altamente higiênicas (VILLAS-BÔAS, 2012).



Figura 3: Depósitos de excremento em melgueiras de uruçú-nordestina, antes da produção de mel (esquerda), foto à direita mel produzido sobre os excrementos das abelhas.

Fonte: Villas-Bôas (2012).

3.1.1 Mel de abelhas meliponas Jataí (*Tetragonisca angustula*)

Dentre as diversas espécies de abelhas meliponas difundidas no território brasileiro a Jataí (Figura 4) pode ser encontrada facilmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, conforme observado na Tabela 1. A abelha Jataí destaca-se pelo alto valor nutricional de seu mel, sendo um produto rico em açúcares, ácidos orgânicos, vitaminas e componentes bioativos como compostos fenólicos (BOBANY et al., 2010). Estas abelhas são facilmente adaptáveis e bastante mansas, podendo ser criadas racionalmente em áreas rurais ou urbanas. Seu mel é composto essencialmente de frutose, uma substância mais doce que a sacarose, numa

concentração de 45%; também 25% de glicose, menos doce que a sacarose, além de elevada umidade. Sua produção por colônia não ultrapassa 1 Litro por ano, porém este mel é muito apreciado e de sabor peculiar (FABICHAK, 1987).



Figura 4: Abelha Jataí (*T. angustula*) e sua entrada de ninho.
Fonte: <http://meldeabelhajatai.blogspot.com.br/>

O alto valor de umidade deste mel faz dele mais suscetível à deterioração. Desta forma a busca por alternativas de aproveitamento deste alimento é importante para que o mesmo seja difundido no comércio brasileiro.

3.2 FRUTO DE MIRTILO

O mirtilo é um fruto pouco conhecido no Brasil e seu cultivo é ainda recente e pouco difundido. Por preferir baixas temperatura, pode ser facilmente produzido no Estado do Rio Grande do Sul, o qual foi pioneiro no cultivo das diferentes frutíferas, trazidas em 1980 pela EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas - RS) e sendo o *Vaccinium ashei* a espécie mais adaptável às condições do sul do Brasil (MORAES et al., 2007; GOLDMEYER et al., 2014).

Originário de algumas regiões da Europa e América do Norte, é amplamente apreciado por seu sabor exótico, valor econômico e por suas aplicações medicinais como “fonte de longevidade” (GOLDMEYER et al., 2014). O mirtilo é classificado como a fruta fresca mais rica em antioxidante já estudada, tendo um conteúdo elevado de polifenóis tanto na casca quanto na polpa. Pertencente ao grupo das pequenas frutas como morango, framboesa e amora preta (MORAES et al., 2007).

Tal fruto (Figura 5) possui diâmetro entre 8 e 22 mmol/L, de sabor agridoce, com diversas propriedades nutraceuticas (ANTUNES et al., 2008).

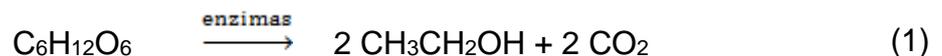


Figura 5: Fruto mirtilo (*Vaccinium ashei*)

Fonte: <http://flora1000flores.blogspot.com.br/2011/03/fruta-exotica-mirtilo-vaccinium-ashei.html>

3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

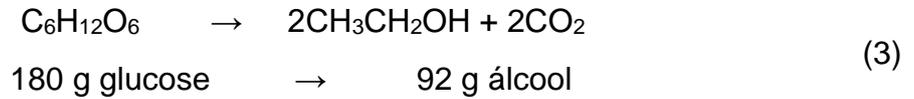
A fermentação alcoólica é um processo que resulta na transformação de açúcares solúveis em etanol, como produto principal (ILHA et al., 2008). A transformação bioquímica da glicose em etanol por alguns microrganismos fermentadores pode ser observada na equação (1):



A transformação da glicose (ou outro monossacarídeo) em duas moléculas de etanol e gás carbônico é realizada devido à presença de certas enzimas produzidas por leveduras. No caso de uma molécula de sacarose a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz uma enzima chamada invertase, a qual “quebra” a molécula em glicose e frutose, para posterior consumo, conforme demonstrado na equação (2) de forma simplificada (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).



O rendimento teórico da fermentação alcoólica é facilmente calculado pelo balanço material representado pela equação (3), a seguir:



Desta forma para cada 100 g de glucose, 51,10 g de álcool etílico (etanol) ou 64,76 mL de álcool (densidade igual 0,789 g/cm³ a 20 °C) são produzidos. Porém como uma parte do açúcar é usado para a formação de células, formação de glicerol, ácido succínico e demais produtos secundários, na prática, considera-se que 1 °Brix fornece 0,5 °GL de álcool (ILHA et al., 2008, GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A quantidade de açúcar residual (após término de fermentação) em vinhos ou fermentados de frutas define a classificação dos mesmos: a primeira classe apresenta os vinhos do tipo seco, com até 5 g/L de açúcares totais, a segunda entre 5,1 e 20 g/L são do tipo meio seco e a terceira e última é a classe dos vinhos suaves ou doces com mais de 20,1 g/L (ALMEIDA et al., 2006).

A água utilizada para o preparo de mostos, cujas matérias-primas não possuam fase líquida suficiente (mel, cereais, banana, maçã, caqui etc.), deve ser potável, de baixa dureza, livre de sedimentos ou partículas em suspensão e isenta de cloro (AQUARONE et al., 1983).

O controle de oxigênio em uma fermentação (Figura 6) é fundamental, pois, na presença do mesmo, as leveduras seguem a rota de respiração celular, ou seja, utiliza o O₂ como acceptor final de elétrons, com intuito de produção de ATP (38 são gerados). Na ausência (ou pouca quantidade) de oxigênio, o que é de interesse, não há cadeia de transporte de elétrons, desta forma a produção de ATP fica restrita às reações de fosforilacão a nível de substrato fazendo com que as leveduras atuem em atividade fermentativa, desta forma, o ácido pirúvico é convertido em gás carbônico e acetaldeído, sendo este último reduzido a álcool etílico (acceptor final de elétrons), neste processo apenas 2 ATP são gerados (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

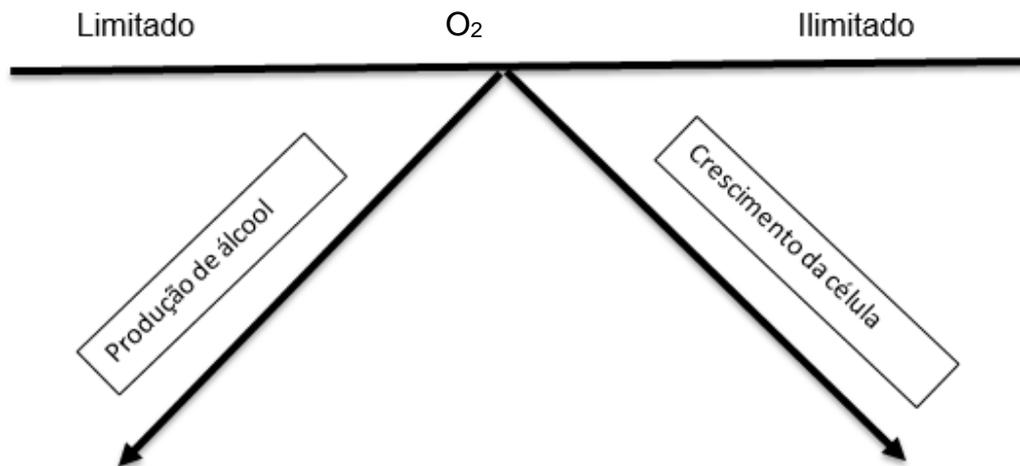


Figura 6: Atividade das leveduras em função do oxigênio disponível. Imagem representativa.

Fonte: GAVA; SILVA; FRIAS (2009)

3.3.1 Hidromel

Ao longo do tempo, diversos povos no mundo inteiro, utilizaram distintas fontes de açúcares das quais dispunham em seus territórios para a produção de diversas bebidas alcoólicas, atualmente conhecidas como vinho, cerveja, hidromel, entre outros (NETO et al., 2012; CHAGAS, 2009). Segundo Chagas (2009) análises químicas de compostos orgânicos absorvidos em frascos de cerâmica da província de Henan, na China, revelaram que uma mistura fermentada de arroz, mel e frutas já era produzida há sete milênios antes de Cristo.

Também conhecido como vinho de mel, o hidromel é considerado uma das primeiras bebidas fermentadas já produzidas, com origem africana datada de milhares de anos (RIVALDI et al., 2009; SCHRAMM, 2003). No entanto, com o desenvolvimento das civilizações e dos recursos agrícolas, a produção de hidromel diminuiu e passou a ser substituído por outras bebidas (FERNANDES et al., 2009). Somente nas regiões mais frias do norte da Europa esta bebida continuou a ser produzida e consumida (CHAGAS, 2009). No Brasil, esse tipo de produto ainda é pouco conhecido, possivelmente pela falta de incentivo a estudos tecnológicos para obtenção artesanal e industrial do produto, além das dificuldades com a legislação vigente (PIRES et al., 2013; MATTIETTO et al., 2006). Machado et al., (2012), ressaltam que a falta de incentivos governamentais para estimular as parcerias entre

universidades e empresas é um dos fatores responsáveis por um panorama de poucas patentes depositadas no Brasil.

Classificado em seco, licoroso, doce e espumoso segundo a tecnologia empregada na sua fabricação, o hidromel tem sua produção dependente do tempo de fermentação, da quantidade do mel utilizada e da graduação alcoólica resultante (GOMES, 2010; FERNANDES et al., 2009; ILHA et al., 2008; RIVALDI et al., 2009). Porém, além de sua formulação básica (mel, água, levedura e sais minerais) Schrammol/L (2003), destaca que o hidromel pode também ser acrescido de ervas e/ou frutas durante ou depois da fermentação, o que resulta em uma ampla variedade de produtos, das mais variadas colorações e sabores, sendo então, classificados em diferentes categorias: “Tradicional”, o que apresenta um sabor próprio e característico; “Melomel”, com sabor realçado com frutas e cereais, como cevada maltada e lúpulo; entre outras possibilidades.

No Brasil, de acordo com a Portaria Nº 64, de 23 de abril de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 2008, Anexo III (Regulamento Técnico para a Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Hidromel) (BRASIL 2008), o hidromel é uma bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelhas, sais nutrientes e água potável. É importante ressaltar que, segundo Aquarone et al., (1993) só é permitido o uso do termo vinho para fermentados provenientes das uvas.

O tempo de fermentação e maturação do hidromel varia de alguns meses a anos. Definir as condições ideais de pH, temperatura e composição do meio de cultura é de extrema importância para a realização de experimentos que visam a otimização dos bioprocessos. Os protocolos de otimização são de sigilo absoluto, visto que são soluções tecnológicas que maximizam variáveis importantes do processo, reduzindo custos e evitando problemas de desuniformidade dos produtos finais (PIRES et al., 2013). Estes ajustes atualmente continuam sendo elaborados empiricamente, uma combinação de arte e ciência, sendo obtidas bebidas muito distintas (GOMES, 2010).

Kempka e Mantovani (2013) estudaram a adição de pólen ao mosto e concluíram que de fato a suplementação do mosto de mel de angico com pólen, melhora o desempenho da fermentação. Tais autores verificaram produção de 61,5% de etanol em 72 horas nas fermentações do mosto suplementado em

comparação às fermentações com mosto sem suplementação. Os minerais contidos no mel se encontram em quantidades muito pequenas para propiciar uma fermentação eficiente, por isso, é interessante potencializar o crescimento das leveduras mediante a adição de nutrientes (ILHA et al., 2008).

Mattietto et al., (2006) comentam que o processo de fermentação dura de 15 a 25 dias, dependendo das condições de processo e da forma em que foi conduzido. Tal processo deve ser acompanhado pelo consumo de açúcar presentes no mosto e por meio da determinação do teor de sólidos solúveis, com auxílio de refratômetro.

3.3.2 Leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*

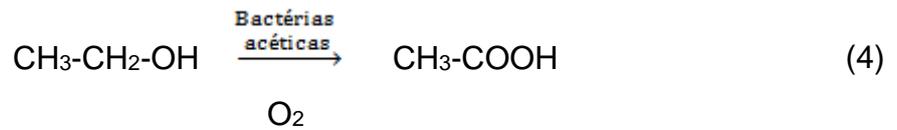
Segundo Gomes (2010), na produção de hidromel as leveduras mais utilizadas são normalmente estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas também para produção de vinho, cerveja e espumante.

Definir o controle da temperatura do substrato pode favorecer o desenvolvimento microbiano, pois cada grupo de microrganismo possui uma temperatura adequada de crescimento. Para as leveduras alcoólicas são recomendadas temperaturas entre 10 a 30 °C (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

3.4 OXIDAÇÃO ACÉTICA

A acetificação é a transformação do fermentado alcoólico de mosto de frutas, cereais, mel, mistura de vegetais, ou mistura hidroalcoólica em ácido acético, (AQUARONE et al., 1983). Porém, tal transformação requer alguns requisitos básicos como o teor alcoólico e acidez iniciais; concentração de nutrientes; temperatura; oxigenação e tempo de processo (RIZZON e MENEGUZZO, 2006).

A reação básica de acetificação é a oxidação do álcool etílico em ácido acético, conforme demonstrado na equação (4). Tal processo ocorre via bactérias acéticas na presença de oxigênio (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). A reação de conversão do etanol a ácido acético é de: 1,0 g de etanol rende 1,3 g de ácido acético (ILHA et al., 2000).



Os processos de fabricação podem ser classificados como, lento, rápido e submerso. O processo lento é o mais antigo e admite-se produzir vinagres de excelente qualidade. Para tal fim, este processo usa como dorna (Figura 07), um barril de carvalho ou de outra madeira que não confira propriedade sensoriais indesejáveis ao produto. Tal barril deve conter em suas laterais aberturas para entrada de ar, sendo cada abertura devidamente protegida por telas. Para adição do fermentado alcoólico, um tubo em forma de “J” deve ser fixado no centro da dorna e para retirada do vinagre uma torneira de madeira deve ser acoplada num dos lados frontais da dorna. A temperatura neste processo pode ser ambiente, contudo é indicado que a mesma não exceda os 25 °C, para evitar evaporação do álcool (ARAÚJO et al., 2012; RIZZON e MENEGUZZO, 2006).

Outras adaptações podem ser feitas, como colocar um quadriculado de madeira que flutue na superfície do mosto, com a finalidade de suportar a película que se forma com o tempo na superfície do meio de fermentação. Este biofilme microbiano é conhecido como mãe do vinagre, sendo constituída de material polimérico (celulose bacteriana) de consistência gelatinosa. A espessura de tal película aumenta com o tempo e acaba submergindo caso não haja o suporte (quadriculado), levando ao aumento do tempo do processo de acetificação, já que outra película terá que se formar, pois é ela que mantém os microrganismos na superfície do meio em contato com o ar e o álcool ao mesmo tempo (AQUARONE et al., 1983).

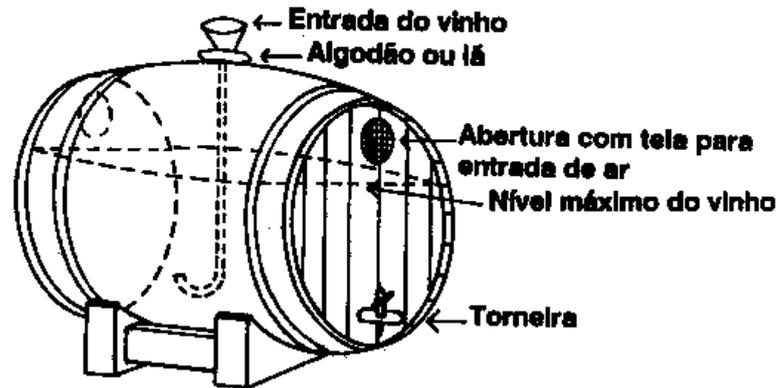


Figura 7: Recipiente utilizado para elaboração de vinagre pelo processo Orleans. Imagem representativa.
Fonte: Aquarone et al., (1983).

3.4.1 Vinagre

O vinagre é utilizado no mundo inteiro a milhares de anos, como alimento, conservante de alimentos e condimento, conferindo sabor ácido e características marcantes nos alimentos, além de evitar o crescimento de microrganismos. Considerado também como um importante complemento ao organismo humano, pela ação nutritiva e biorregulatória (BORTOLINI et al., 2001).

Além dos benefícios para a saúde, o vinagre representa também um importante papel na questão econômica. Marques et al., (2010) apontam que propriedades rurais podem utilizar os excedentes de safra para produção de vinagre, evitando descarte sem prévio aproveitamento. Tais autores, assim como Bortolini et al., (2001), destacam o potencial dos vinagres de frutas, os quais são considerados superiores em qualidade sensorial e nutritiva, quando comparados a outros tipos de vinagres. Tais vinagres apresentarem vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos provenientes do fruto e da fermentação alcoólica.

O fermentado acético pode apresentar várias classificações de acordo com a origem da matéria-prima (MARQUES et al., 2010). A expressão vinagre usada isoladamente é privativa ao fermentado acético do vinho. Produtos resultantes de matérias-primas distintas são denominados de fermentados acéticos seguidos pelo nome do produto de origem (RIZZON e MENEGUZZO, 2006).

Segundo a Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012, considera-se que o vinagre de mel com frutos é um produto composto, o qual deve apresentar acidez volátil mínima de 4 g/100g; máximo de teor alcoólico de 1% (v/v) resíduo mineral

máximo de 5,0 (g/L) e mínimo de 1,0 (g/L); valor mínimo de extrato seco reduzido de 7 g/L e sulfatos, expressos em g/L de sulfato de potássio máximo de 1.

3.4.2 Bactérias acéticas

Na produção do vinagre, ou seja, acetificação (oxidação acética), uma cultura mista de *Acetobacter* sp., contendo diferentes espécies ou linhagens deste gênero é utilizada como inóculo. Há centenas de espécies, subespécies e variedade do gênero *Acetobacter* sp., porém, poucas destas apresentam potencial industrial. As mais indicadas para uso comercial, devem produzir concentrações elevadas de ácido acético; não formar material viscoso; e de preferência não completar a oxidação até anidrido carbônico e água, apresentar tolerância a concentrações razoáveis de etanol e ácido acético e ter eficiência fermentativa em temperaturas entre 25 e 30 °C. Alguns exemplos de bactérias atendem estes requisitos como *Acetobacter aceti*, *A. xylinoides*, *A. orleanense*, *A. acetigenum*, *A. schetzenbachii*, *A. curvum* e *A. rances* (RIZZON e MENEGUZZO, 2006; AQUARONE et al., 1983).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais de fermentação, bem como as análises dos parâmetros físico-químicos foram desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos na Central de Análise Multiusuário da UTFPR, campus Pato Branco – Paraná.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Mel

Foram utilizados cerca de 370 mL de mel de melíponas (*Tetragonisca angustula*) adquirido em propriedade localizada no município de Francisco Beltrão, PR. O produto foi mantido em temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C ± 2), em ambiente livre de odores, até o momento da caracterização físico-química e produção dos fermentados alcoólico e acético.

4.1.2 Mirtilo

Os frutos de mirtilo cultivados e adquiridos no município de Palmas, Paraná, foram descongelados e submetidos ao despulpamento em processador com posterior filtragem em pano de morim, objetivando a separação das sementes e cascas. Foram utilizados cerca de 1650 mL de polpa de mirtilo.

4.1.3 Micro-organismos

Na fermentação alcoólica foi empregado fermento comercial constituído de cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae bayanus* Pasteur Champagne (Red star). Na oxidação acética foi empregada microbiota mista de bactérias ácido-acéticas isoladas de vinagre de vinho tinto não pasteurizado adquirido na Feira do Produtor no município de Pato Branco, Paraná.

4.1.4 Sais minerais e reagentes químicos

Os sais minerais empregados no preparo dos meios de cultivo e os reagentes utilizados no preparo de soluções usadas nas determinações químicas foram de grau analítico. Na fermentação alcoólica foi empregado ENOVIT[®] (AEB Bioquímica), como ativador de crescimento das leveduras e na acetificação foi utilizado Acetozyn[®] que contém nutrientes necessários para o crescimento das bactérias acéticas.

4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

4.2.1 Preparo do mosto para a fermentação alcoólica

O mosto foi obtido pela mistura de mel de meliponas Jataí (*Tetragonisca angustula*) e polpa de mirtilo conforme Figura 8. Foi empregada uma quantidade de mel e polpa necessária para obtenção de teor de sólidos solúveis de 18 °Brix.

O mosto foi suplementado com mistura ativadora de crescimento (30 g/h L) Enovit (Pascal Biotech - Paris, França) constituído de: sulfato de amônio (70%), fosfato de amônio dibásico (19,8%), celulose quimicamente inerte (10%) e cloridrato

de tiamina, vitamina B1 (0,20%). Além disto o mosto foi sulfitado com Metabissulfito de sódio na proporção de 50 mg/L.



Figura 8: Polpa de mirtilo e mel utilizados no preparo do mosto.

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Preparo do inóculo para fermentação alcoólica

Na etapa de preparo do inóculo para a fermentação alcoólica, a levedura comercial liofilizada foi reidratada em meio extrato de malte (20 g/L extrato de malte, 1 g/L peptona e 20 g/L de glicose). A pré-cultura foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL em incubadora orbital (shaker) por 24 horas a 28 °C. As células foram recuperadas por centrifugação (1350 rpm, 15 minutos), lavadas e ressuspensas em solução salina esterilizada (0,9%, m/v). Como inóculo foi empregado um volume de suspensão celular necessário para obter uma concentração inicial de 1×10^6 células/mL. A contagem inicial e final das células foi realizada em câmara de Neubauer.

4.2.3 Descrição da fermentação alcoólica

A fermentação do mosto foi conduzida em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha) equipado com eletrodo de pH, termopar e oxigênio (Figura 9). A fermentação foi acompanhada através do consumo dos açúcares via determinação de teor de sólidos solúveis totais (°Brix) por refratômetro portátil, e produção de CO₂. Amostras de aproximadamente 15 mL do mosto em fermentação foram retiradas ao longo do processo em intervalos de 12 horas. Foram realizadas análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, etanol e açúcares redutores totais. Ainda, ao término da fermentação foram realizados os cálculos de rendimento e eficiência de fermentação alcoólica, bem como os cálculos de produtividade volumétrica em etanol e taxa global do consumo do substrato.

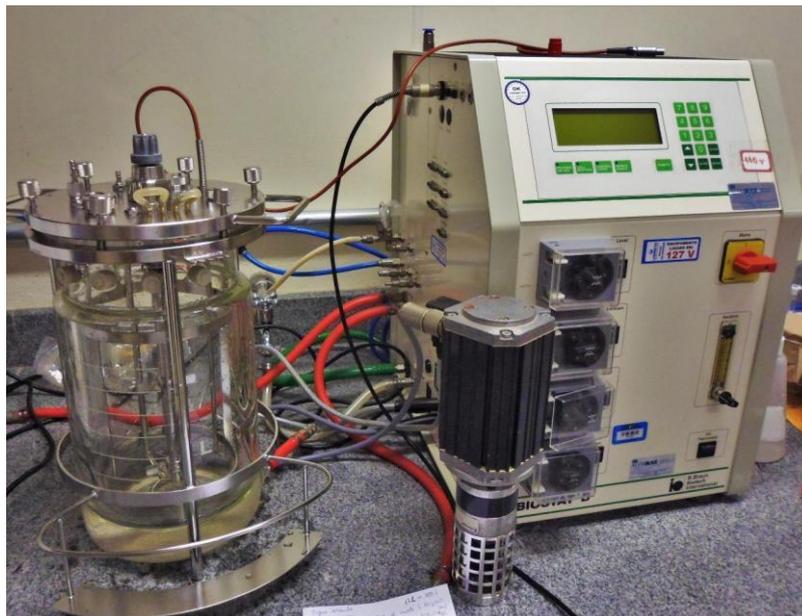


Figura 9: Fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).

Fonte: Autoria própria.

4.2.4 Procedimento experimental da fermentação alcoólica

Com o mosto suplementado e sulfitado (conforme item 4.2.1), o procedimento de fermentação iniciou-se com o preparo de pé de cuba (inóculo de fermentador). Para tanto, foram adicionados ao fermentador de bancada 10% (200 mL) do volume

total de mosto (2000 mL), juntamente com as leveduras já devidamente preparadas conforme item 4.2.2. O meio obtido conforme demonstrado na Figura 10, foi levemente agitado por 5 minutos e deixado em condições estáticas por 24 horas em temperatura de 28 °C.

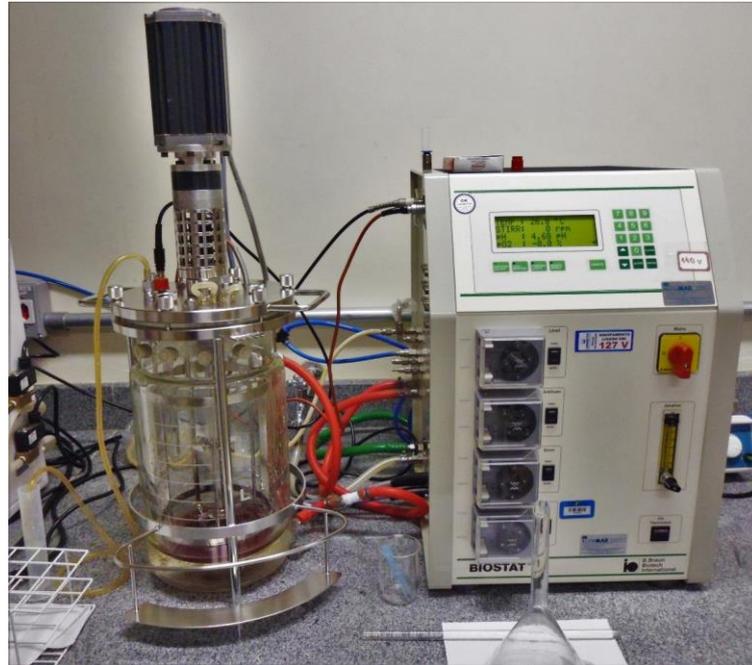


Figura 10: Inóculo (pé de cuba) em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).

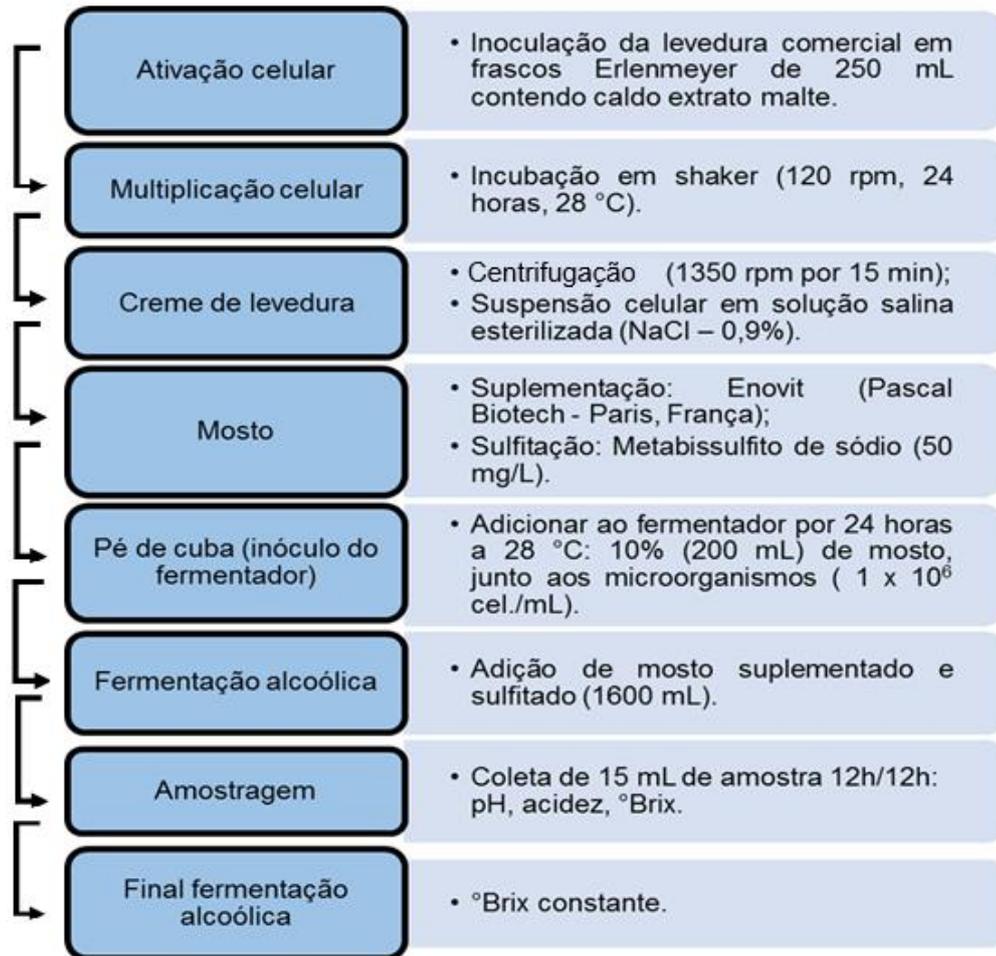
Fonte: Autoria própria.

Após o preparo do de pé de cuba, o restante do mosto foi adicionado ao fermentador, conforme apresentado na Figura 11, sendo agitado levemente por 5 minutos e deixado em condições estáticas em temperatura de 28 °C. O controle de fermentação foi acompanhado por meio do consumo de açúcares (°Brix) e desprendimento de CO₂.



Figura 11: Fermentação alcoólica de mosto de mel de Jataí e mirtilo em fermentador de bancada do tipo tanque agitado (Biostat B, B. Braun, Alemanha).
Fonte: Autoria própria.

O Fluxograma 1 descreve passo a passo o procedimento utilizado na elaboração do fermentado alcoólico.



Fluxograma 1: Procedimento da fermentação alcoólica.

4.2.5 Cálculo do rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica.

O rendimento ($Y_{P/S}$) da fermentação alcoólica foi calculado segundo a equação (5), correlacionando-se os valores de etanol produzido (m/v) com os teores de açúcares consumidos (m/v). Sendo, $Y_{P/S}$ o rendimento em produto (g/g), ΔP a variação da produção em etanol (g/L) e ΔS o consumo de substrato (g/L).

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (5)$$

A produtividade (Q_P) foi determinada pela correlação entre etanol produzido (g/L) e o tempo da fermentação (h), segundo equação (6). Q_P corresponde à produtividade volumétrica em etanol (g/L h), P a concentração final de etanol (g/L),

P_0 a concentração de etanol no instante inicial (g/L) e t_f é o tempo de fermentação (h).

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t_f} \quad (6)$$

A eficiência da fermentação foi determinada pela relação entre o rendimento observado no processo ($Y_{P/S}$) e o rendimento teórico (0,511 g/g) da fermentação alcoólica, conforme demonstrado na equação (7).

$$n (\%) = \frac{Y_{P/S} \text{ prático}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \times 100 \quad (7)$$

A velocidade de consumo do substrato (Q_S) foi determinada pela correlação entre consumo de substrato (g/L) e o tempo da fermentação (h), segundo equação (8). Q_S corresponde taxa de consumo do substrato (g/L h), S_0 a concentração de substrato no instante inicial (g/L), S a concentração final de substrato (g/L) e t_f é o tempo de fermentação (h).

$$Q_S = \frac{S_0 - S}{t_f} \quad (8)$$

4.3 OXIDAÇÃO ACÉTICA

4.3.1 Preparo do inóculo para a acétificação

Para a oxidação acética, uma alçada de células de bactérias ácido-acéticas, previamente isoladas (conforme item 4.1.3), foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio GY (glicose 10%, extrato de levedura 1% e natamicina 100 mg/L) e cultivadas em incubadora orbital por 48 horas a 28 °C. As células foram recuperadas, lavadas e ressuspendidas em solução salina esterilizada a 0,9% (m/v) e utilizadas como inóculo.

4.3.2 Procedimento experimental da acetificação

Foi utilizado o processo lento de produção de vinagre (processo Orleans) realizado em vinagreira de madeira grápia, com capacidade de 2,5 L (Figura 12). O volume de trabalho foi de 1,5 L a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Após o término da fermentação alcoólica e centrifugação do melomel, o mesmo foi suplementado com nutriente Acetozyn® (0,1%) e 10% (150 mL) do seu volume total (1500 mL) foi adicionado à vinagreira de grápia, juntamente com o inóculo das bactérias ácido-acéticas, previamente preparadas conforme item 4.3.1, em temperatura ambiente (cerca de 22 ±2 °C) durante 24 horas.



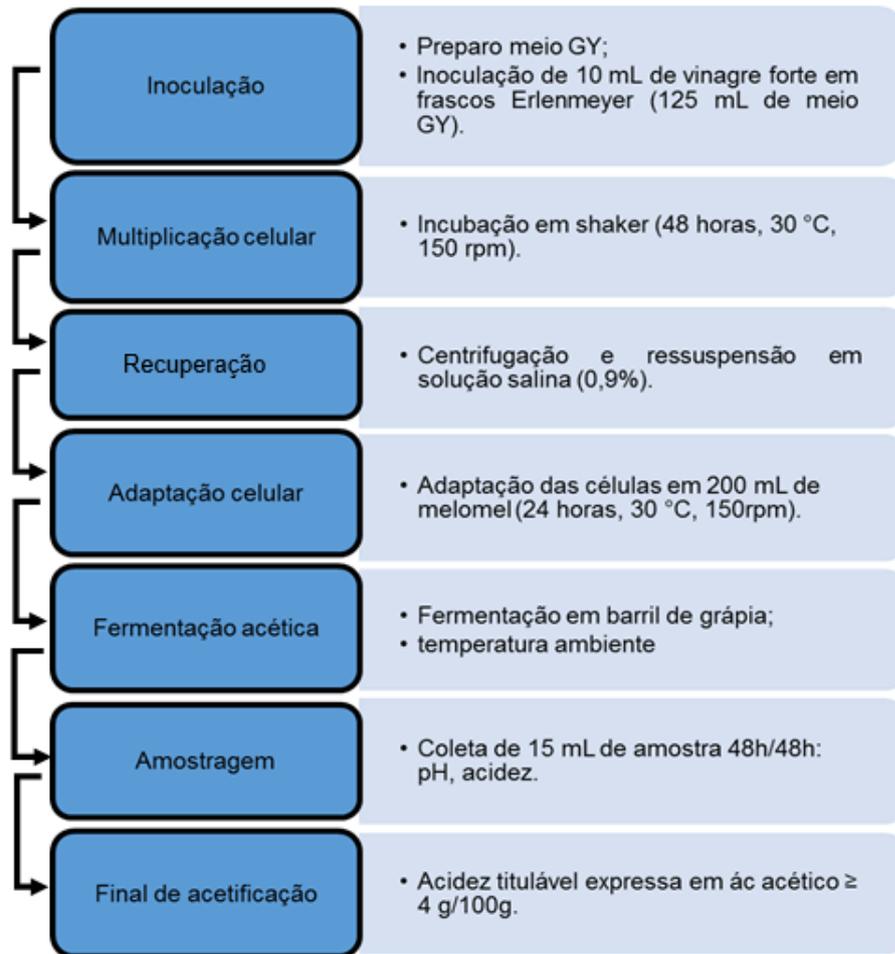
Figura 12: Vinagreira de grápia do laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos da UTFPR, câmpus Pato Branco.
Fonte: Autoria própria.

Decorridas 24 horas de inoculação o restante do mosto foi adicionado conforme descrito em literatura, por meio de tubo em “J” previamente adaptado na vinagreira. A fermentação correu em condições estáticas a temperatura ambiente (± 22 °C). Amostras de 15 mL do meio em fermentação foram retiradas ao longo do processo em intervalos de 48 a 60 horas para análises de pH, acidez total titulável, etanol e ácido acético. Ao final da acetificação o rendimento da fermentação acética

foi determinado e expresso pela relação entre a produção observada de ácido acético em relação ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$).

O término da acetificação foi estimado quando a acidez atingiu o mínimo exigido em legislação (4 g/100g).

O Fluxograma 2 exemplifica como foi realizado o processo de acetificação.



Fluxograma 2: Procedimento operacional da oxidação acética, conduzida em vinagreira de grápia (processo lento).

4.3.3 Cálculo do rendimento e produtividade acetificação

O rendimento da oxidação acética foi determinado e expresso pela relação entre a produção observada de ácido acético e o rendimento teórico ($Y_{P/S}$). O rendimento teórico é calculado a partir da reação de conversão do etanol a ácido acético, onde 1,0 g de etanol rende 1,3 g de ácido acético (ILHA et al., 2000).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para caracterizar o mel, foram determinados os seguintes parâmetros: umidade, resíduo mineral (cinzas), atividade de água, pH, acidez total, cor, sólidos solúveis totais, açúcares redutores totais, sacarose aparente, atividade diastásica e as reações de Lund, Fiehe e de Lugol segundo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Foi também avaliada a atividade antioxidante do mel pelos métodos DPPH^{*} (Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995)), ABTS^{•+} (RUFINO et al., 2007) e FRAP (poder redutor férrico) descrito por Rufino et al., (2006). O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (BUDAK et al., 2010; SINGLETON et al., 1999).

O fermentado alcoólico foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH, sólidos solúveis (°Brix), acidez total, seguindo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), bem como açúcares totais, conforme metodologia descrita Miller et al., (1959). Ainda, o conteúdo de etanol, glicose, frutose e sacarose no melomel, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O fermentado acético obtido foi caracterizado quanto aos parâmetros: pH e acidez total, e os teores de ácido acético e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os fermentados alcoólicos e acéticos também foram caracterizados quanto a atividade antioxidante pelos métodos DPPH^{*} (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995), ABTS^{•+} (RUFINO et al., 2007) e FRAP (RUFINO et al., 2006) e ainda foi avaliado o conteúdo de fenólicos totais (BUDAK et al., 2010; SINGLETON et al., 1999).

4.4.1 Determinação de umidade

O método aplicado baseia-se na determinação da perda de massa por secagem em condições especificadas de temperatura e tempo. Seguindo protocolo Adolfo Lutz (2008)

Foram preparadas em triplicata cerca de 5 g de amostra de mel totalmente homogeneizada em uma cápsula, previamente tarada. As amostras foram secas em estufa durante 24 horas a 105 ± 2 °C. As cápsulas foram retiradas da estufa, resfriadas em dessecador e pesadas. O processo foi repetido até que o peso entre

duas secagens não se ultrapassa a de diferença ≤ 2 mg. A equação (9) descreve os cálculos realizados.

$$\frac{N \times 100}{P} = \% \text{ de umidade} \quad (9)$$

N = perda de massa em g

P = massa da amostra em g

4.4.2 Determinação de resíduo mineral (cinzas)

O resíduo mineral fixo foi determinado gravimetricamente após incineração das amostras em forno mufla a 550 °C e calculado conforme equação (10) abaixo:

$$\frac{N \times 100}{P} = \% \text{ de cinzas} \quad (10)$$

N = perda de massa em g

P = massa da amostra em g

4.4.3 Determinação de atividade de água

A atividade de água do mel foi obtida por meio de leitura em determinador de atividade de água Aqualab (modelo 4 TE).

4.4.4 Determinação pH

Foram pesados 10 g de amostra de mel e diluídas com 100 mL de água em um Becker e o pH foi determinado após agitação em pHmetro previamente calibrado (ADOLFO LUTZ, 2008).

No caso do melomel e do vinagre, procedeu-se a retirada de alíquota de 5 mL, sendo realizadas leituras diretamente nas amostras.

4.4.5 Determinação de acidez total

Para determinação da acidez total foram transferidos 5 mL da amostra (mel, melomel e vinagre) para bécker e adicionado 50 mL de água destilada. A mistura foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L potenciometricamente. Posteriormente foi realizado o cálculo conforme equação (11).

$$Acidez (\%) = \frac{Vg \times M \times f \times MM}{V \times 10 \times n} \quad (11)$$

Onde:

Vg: volume gasto de solução de NaOH na titulação (mL).

M: Molaridade da solução de hidróxido de sódio.

MMOL/L: massa molecular do ácido correspondente em g (192 g para ácido cítrico e 60 g para ácido acético).

n: número de hidrogênios ionizáveis (n= 3 para ácido cítrico e n= 1 para ácido acético).

V: volume de amostra em mL.

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio.

4.4.6. Determinação de cor

A cor do mel foi determinada em aparelho colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400, previamente calibrado conforme as especificações do fabricante, obtendo-se os parâmetros de cor L*, a*, b*, bem como angulo (h).

4.4.7 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix)

A determinação de sólidos solúveis foi realizada em refratômetro portátil.

4.4.8 Determinação de açúcares redutores totais por solução de Fehling

Esta análise foi realizada para determinação dos de açúcares redutores totais do mel, conforme descrito por Adolfo Lutz (2008). Pesou-se cerca de 2 g da amostra

homogeneizada de mel, a qual foi diluída em um balão volumétrico de 200 mL. Desta solução 50 mL foi pipetada para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. Pipetou-se 5 mL da solução de Fehling A, 5 mL da solução de Fehling B e adicionou-se 7 mL de água em um Erlenmeyer de 250 mL. Na bureta foram colocados 25 mL da solução de mel diluída e adicionados 15 mL no Erlenmeyer. A solução foi aquecida e mantida em ebulição moderada por 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de solução de azul de metileno (0,2 % m/v) enquanto ainda em ebulição e procedeu-se a titulação, dentro de um tempo máximo de 3 minutos, adicionando gota a gota a solução diluída de mel até a descoloração do indicador. O volume gasto da solução de mel foi anotado (V' mL). Novamente a titulação foi realizada, usando 5 mL de cada solução de Fehling, (25 – V' mL) de água e adicionado com a bureta o volume da solução diluída de mel gasto na titulação preliminar (V' mL) menos 1,5 mL. A solução foi aquecida até a ebulição, foi adicionado 1 mL de solução de azul de metileno (0,2 % m/v) e completada a titulação, dentro de 3 minutos, adicionando gota a gota a solução diluída de mel até a descoloração do indicador. As titulações em duplicata concordaram no valor dentro de 0,1 mL. Os cálculos foram realizados conforme equação (12).

$$\frac{2 \times 10000}{P \times V} = \text{açúcares redutores, em açúcares invertido, g/100g} \quad (12)$$

Onde:

P = massa de amostra em g

V = nº de mL da solução diluída da amostra gasto na titulação

4.4.9 Determinação de sacarose aparente

A análise de sacarose aparente para o mel procedeu-se após análise de açúcares redutores totais por solução de Fehling, conforme descrito por Adolfo Lutz (2008). Pipetou 50 mL da solução de mel obtida na determinação de açúcares redutores, para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 25 mL de água. A solução foi aquecida a 65 °C em banho-maria. Logo após foi adicionados 10 mL de solução de ácido clorídrico. Esperou-se a solução resfriar naturalmente até a temperatura ambiente. A solução foi neutralizada com hidróxido de sódio. O volume

foi completado com água. O procedimento de titulação decorreu como na determinação de açúcares redutores.

4.4.10 Determinação de açúcares totais por DNS

Esta análise foi realizada para as amostras de melomel e vinagre, conforme descrito por Miller et al., (1959). A solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) foi preparada através da diluição de 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Posteriormente a esta solução foram adicionados 306,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol sob aquecimento a 50°C até completa dissolução. Inicialmente 1,0 mL de amostra foi hidrolisada com 30 µL de HCl concentrado, sob aquecimento em banho-maria fervente por 10 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo, seguida de neutralização com 30µL de NaOH 40%. Para a quantificação dos açúcares, 1 mL da mistura hidrolisada foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 1,5 mL de solução de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). A mistura foi aquecida por 5 minutos em banho-maria em ebulição e após resfriamento foram adicionados 5 mL de água destilada e realizadas leituras em espectrofotômetro a 550 nm. Como branco foi utilizada mistura de 1 mL de água e 1,5 mL de solução de DNS e após resfriamento adição de 5 mL de água. Os resultados foram calculados através de correlação com curva padrão de glicose 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 e 0,9 mg/mL.

4.4.11 Determinação de atividade diastásica

O espectrofotômetro foi ajustado para leituras de absorvância a 660 nm. Pesou-se cerca de 10 g de amostra de mel, o qual foi dissolvido em 15 mL de água, adicionaram-se 5 mL de solução-tampão de acetato pH 5,3 (1,59 M) e a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, contendo 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,5 M, completando-se o volume com água. Sobre 10 mL desta solução, foi adicionado 5 mL de solução de amido e colocado a mistura em banho de água a 40 ±1 °C por 15 minutos, com agitação periódica. Em intervalos de 5 minutos, foram pipetadas alíquotas de 1 mL desta solução e adicionado rapidamente 10 mL de solução de iodo diluída 0,00035 mol/L. Determinou-se a absorvância a

660 nm, até obter-se um valor de absorvância menor que 0,235. Posteriormente foi realizado cálculo conforme equação abaixo (13).

$$\frac{300}{t_x} = \textit{atividade diastásica} \quad (13)$$

tx= o tempo da reação em minutos

4.4.12 Determinação de Lund

Foi pesado com precisão 2 g da amostra. Transferida para proveta de 50 mL, com o auxílio de 20 mL de água. Foram adicionados 5 mL de solução de ácido tânico 0,5% e água até completar o volume de 40 mL. A solução foi agitada até completa homogeneização e deixada em repouso por 24 horas.

O resultado do ensaio é lido da seguinte forma: na presença de mel puro, será formado um precipitado no fundo da proveta no intervalo entre 0,6 e 3,0 mL. Na presença de mel adulterado, não haverá formação de precipitado ou excederá o volume máximo do referido intervalo.

4.4.13 Determinação de Fiehe

A reação de Fiehe com resorcina em meio ácido pode indicar a presença de substâncias produzidas durante o superaquecimento de mel ou a adição de xaropes de açúcares. Na presença de glicose comercial ou de mel superaquecido, aparecerá uma coloração vermelha intensa, indicando a fraude.

Foi pesado 5 g de amostra em um béquer de 50 mL. Foi adicionado 5 mL de éter e agitado vigorosamente. A camada etérea foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 0,5 mL de solução clorídrica de resorcina e deixado em repouso por 10 minutos.

4.4.14 Determinação de Lugol

A reação com solução de Lugol pesquisa a presença de amido e dextrinas no mel. Na presença de glicose comercial ou xaropes de açúcar, a solução fica colorida de marrom-avermelhada a azul. A intensidade da cor depende da qualidade e da quantidade das dextrinas ou amido, presentes na amostra fraudada.

Foi pesado 10 g da amostra em um béquer de 50 mL. Adicionado 20 mL de água e agitado. A solução foi deixada em banho-maria por 1 hora e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado 0,5 mL da solução de Lugol.

4.4.15 Determinação de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético

O conteúdo de etanol, ácido acético, glicose, frutose e sacarose no mel, melomel e vinagre, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi usado cromatógrafo VARIAN 920 LC, equipado com detector de índice de refração e coluna HPX-87-H (Bio-Rad, Hercules, CA) a 45 °C, sendo usada solução de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) como eluente, taxa de fluxo de 0,6 mL/min. e volume de amostra de 20 µL. As amostras foram adequadamente diluídas, filtradas em filtro CHOMAFIX 45 µm e passadas em SEP PACK C18. Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção com padrões autênticos de glicose, frutose, sacarose, etanol e ácido acético.

4.4.16 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência.

As amostras foram previamente diluídas na proporção de 1:5, onde 0,5 mL foram misturadas em tubos de ensaio com 2,5 mL de Folin Cioalteau a 10% e 2 mL de carbonato de sódio a 4 % (v/v). A mistura foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 2 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV / visível U-2800 Digilab a 765nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições, porém, com a solução extratora substituindo a amostra. Foi construída uma curva padrão de ácido

gálico nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 75 e 100 ppm de ácido gálico diluídos em água destilada. Os resultados foram obtidos por regressão linear da curva analítica e expressos em mg GAE/100g de mel e mg GAE/100mL de melomel e vinagre (GAE: equivalente em ácido gálico) (SINGLETON et al. 1999).

4.4.17 Determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH^{*}

O método de DPPH^{*} utilizado para determinar o potencial antioxidante da amostra, foi conduzido segundo metodologia preconizada por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Foram misturados em tubos de ensaio 0,1 mL de amostra apropriadamente diluída e 3,9 mL de solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina) (0,025 g/L em metanol). A absorvância da mistura foi medida a 515 nm em espectrofotômetro UV / visível U- 2800 Digilab e como branco foi utilizado metanol. Leituras foram tomadas no tempo inicial (t_0) e no tempo 60 minutos (t_{60}), quando a reação atingiu o estado estacionário. Seis concentrações diferentes de Trolox (0,02, 0,06, 0,1, 0,14, 0,18 e 0,22 mmol/L) foram preparadas nas mesmas condições da amostra, sendo, portanto, misturados 0,1 mL de cada concentração de solução de Trolox e 3,9 mL de solução DPPH (0,025 g/L) e utilizadas para construção de uma curva de calibração. Os valores finais foram expressos em $\mu\text{mol Trolox Equivalente/g}$ de amostra (mel) e $\mu\text{mol Trolox Equivalente/100 mL}$ para amostras de melomel e vinagre.

4.4.18 Determinação da atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS^{**}

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{**} ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline)-6-sulfônico foi realizada conforme descrito por Rufino et al., 2007. Inicialmente foram preparadas soluções de ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio (140 mmol/L). O radical ABTS^{**} foi obtido a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS com 88 μL da solução de persulfato de potássio mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 16 horas. 1 mL desta mistura foi diluída em álcool etílico absoluto até obtenção de absorvância de 0,700 nm \pm 0,05 nm a 734 nm de comprimento de onda, sendo utilizada somente no dia da análise.

Em tubos de ensaio foram adicionados 30 μL da amostra e 3 mL da solução de ABTS^{•+} e após agitação os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 6 minutos. As leituras foram realizadas a 734 nm em triplicata e os resultados obtidos por correlação com a curva padrão. O mesmo procedimento reacional foi utilizado para a construção de curva padrão, sendo preparadas diferentes concentrações de trolox (0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2 mmol/L). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μmol Trolox Equivalente/g de mel μmol Trolox Equivalente/100mL para melomel e vinagre.

4.4.19 Determinação da atividade antioxidante utilizando ion férrico (FRAP)

A capacidade antioxidante avaliado pelo método FRAP (poder antioxidante de redução do ferro III) foi determinada conforme descrito por Rufino et al., 2006. Para preparo de solução FRAP foi adicionando 25 mL de solução tampão acetato de sódio pH 3,6 a 2,5 mL de solução TPTZ (2,4,6-Tri-(2-Piridil)-1,3,5-Triazina) e 2,5 mL de solução de cloreto férrico em frasco de vidro e armazenado a 37 °C. Pipetou-se 90 μL da amostra (devidamente diluída) para tubo de ensaio, foi adicionado 270 μL de água destilada e 2,7 mL (2700 μL) de solução de FRAP. Os tubos foram agitados e em seguida foram incubados, ao abrigo da luz, durante 30 minutos a temperatura de 37 °C. A absorbância da mistura foi medida a 595 nm em espectrofotômetro UV/visível U-2800 Digilab, em triplicata, utilizando como branco o reagente FRAP. Os resultados da atividade antioxidante são expressos em μmol de sulfato ferroso/g para mel e μmol de sulfato ferroso/100mL para melomel e vinagre. Para preparo da curva padrão foi utilizado o mesmo procedimento reacional das amostras, porém, substituindo a amostra por soluções de sulfato ferroso (0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mmol/L).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL

A caracterização dos parâmetros físico-químicos do mel está descrita na Tabela 2. Juntamente estão apresentadas as normas de padrões de qualidade de mel no Brasil, contudo como a legislação vigente para mel (Brasil, 2000) ampara apenas a cadeia produtiva da apicultura e como o mel avaliado possui características específicas, uma correlação com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão gênero *Melipona*, do estado da Bahia (Portaria N° 207, 2014) também foi empregada.

Tabela 2: Valores médios dos parâmetros físico-químicos do mel de abelhas meliponas Jataí.

Determinação	Valor médio ± desvio padrão	Legislação*	Portaria 207 #
°Brix	72,2 ± 0,25	-	-
Atividade de água (Aw)	0,72 ± 0,001	-	-
Umidade (g/100g)	23,16 ± 0,04	Máx. 20	Máx. 20 – 35
Resíduo mineral (g/100g)	0,14 ± 0,07	Máx. 0,6	Máx. 0,6
pH	3,87 ± 0,07	-	-
Acidez livre (meq/kg)	47 ± 4,2	Máx. 50,0	Máx. 50,0
Aç. Redutores (g/100g)	56,85 ± 0,35	Min. 65,0	Mín. 60,0
Sac. Aparente (g/100g)	0,98 ± 0,0	Máx. 6,0	Máx. 6,0
Reação de Lund	Negativo	Negativo	-
Reação de Fiehe	Negativo	Negativo	-
Reação com Lugol	Negativo	Negativo	-
Diastase (göthe)	21,4	Mín 8,0	Máx 3,0
a*	- 1,42 ± 0,22	-	-
b*	18,19 ± 0,93	-	-
L*	34,16 ± 1,0	-	-
h*	94,46 ± 0,6	-	-

* Legislação Brasileira (BRASIL, 2000).

Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão gênero *Melipona*, para todo o estado da Bahia (PORTARIA N° 207, 2014)

O teor de sólidos solúveis totais (SST), não é um parâmetro controlado pela legislação, porém para estudo da amostra tal parâmetro foi determinado. O mel utilizado no estudo apresentou valor médio de 72 °Brix, valor este abaixo do

encontrado em mel de abelhas *A. mellifera* por Meireles e Cançado (2013), os quais verificaram valores de 81,55 a 83,85 °Brix. Menor conteúdo de sólidos solúveis totais indica que o mel estudado apresenta menor conteúdo de açúcares e maior conteúdo de água quando comparado ao mel de *A. mellifera*.

Com relação a umidade, foi verificado valor de 23,16 g/100g, o qual como esperado é superior ao valor estabelecido pela legislação brasileira para méis de *A. mellifera*. Entretanto está dentro dos valores preconizados pela Portaria 207 de 21 de novembro de 2014 da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (BAHIA, 2014) para méis de meliponíneos. Villas-Boas e Malaspina (2005) sugerem que para méis de meliponíneos pode haver valores de até 35 g/100g.

O teor de umidade do mel e sua atividade de água (A_w) são os principais fatores que influenciam a preservação do produto, assim como as condições de estocagem (KUROISHI et al., 2012). O elevado conteúdo de umidade torna este mel mais suscetível à deterioração microbiana, fazendo-se necessário e como exigido pela portaria 207, um altíssimo cuidado por parte do produtor, quanto a coleta e armazenamento. Outra condição para a preservação seria o aproveitamento biotecnológico deste mel, preservando suas características e agregando valor ao produto.

A atividade de água verificada foi de 0,72, valor este acima do encontrado por Kuroishi et al., (2012), onde a atividade de suas amostras variaram de 0,563 a 0,576. Logo o mel de Jataí estudado apresentou maior valor quanto ao parâmetro de atividade de água, quando comparado ao mel das abelhas *A. mellifera*.

Quanto ao teor de resíduo mineral, foi observado um valor de 0,14 g/100g, estando este em conformidade com a legislação (BRASIL 2000). Contudo, Anacleto et al., (2009) descreveram valor mais elevado (0,39 g/100g) em mel da mesma espécie de abelha (*T. angustula*). Tal diferença pode estar relacionada a origem botânica, sendo as características físico-químicas dos méis quase que totalmente dependente desta. O valor determinado pela norma brasileira vigente para porcentagem de resíduo mineral é de no máximo de 0,6% e o mesmo valor é sugerido para as amostras de méis de meliponíneos, segundo portaria 207. Desta forma a amostra de mel avaliada encontra-se dentro dos padrões exigidos.

O pH do mel é influenciado pela origem botânica, sendo geralmente inferior a 4,0 em mel de origem floral, podendo ainda ser influenciado pela concentração de diferentes ácidos, cálcio, sódio, potássio e outros constituintes das cinzas

(BARBOSA et al., 2014). Os resultados obtidos para pH e acidez neste trabalho (Tabela 2) foram de 3,87 e 47 meq/kg, respectivamente, estando tais valores próximos ao valor médio observado por Alves et al., (2005) em amostras de méis de meliponíneos Mandaçaia (3,27 e 43,48 meq/kg, respectivamente).

Em trabalho com diferentes espécies de abelhas sem ferrão, Azeredo et al., (1999) constataram valores médios de pH 3,5 e acidez de 27,15 meq/kg, ou seja valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Para o parâmetro pH não há normas vigentes, já para acidez a legislação atual estabelece o valor máximo de 50 meq/kg (BRASIL 2000), bem como pela portaria nº 207. Desta forma, o mel estudado está dentro dos limites estabelecidos. A acidez é um parâmetro importante na prevenção do desenvolvimento de microrganismos no mel e estabilidade do mesmo, bem como está diretamente associada ao sabor do mel (ALVES et al., 2005).

O conteúdo de açúcares redutores foi de 56,85 g/100g, valor inferior ao descrito na legislação brasileira (BRASIL, 2000) e portaria 207, porém, são parecidos com os resultados descrito por Anacleto et al., (2009) em mel de Jataí, onde nenhuma de suas amostras atingiu o mínimo exigido pela legislação (65,00 g/100g). Ainda o conteúdo de açúcares redutores do mel estudado, está em conformidade com a sugestão de Villas-Boas e Malaspina, (2005), os quais sugerem um mínimo de 50 g/100g para méis de meliponíneos. Por outro lado, o teor de sacarose aparente (0,98 g/100g), encontra-se dentro dos parâmetros exigidos na legislação brasileira (BRASIL, 2000). Lira et al., (2014) avaliando méis de *T. angustula* encontraram valores superiores que variaram de 3,89 a 4,02 g/100g de sacarose. Em geral, a sacarose indica o grau de maturação do mel, ou seja, um alto teor deste açúcar no mel indica que o mesmo foi colhido muito cedo, não completando sua transformação em frutose e glicose, por meio da ação de invertases (ALVES et al., 2005).

Em relação aos testes para a detecção de fraudes, as reações de Lund, Fiehe e Lugol (Figura 13 A, B e C, respectivamente) apresentaram resultados negativos. No teste de Lund, foi observado precipitado de 1 mL, estando dentro do intervalo de aceitação (0,6 – 3,0 mL) indicando a presença de albuminoides comuns no mel.

A reação de Fiehe é um teste qualitativo e indica a presença de hidroximetilfurfural (HMF), uma substância derivada da reação de certos açúcares em meio ácido que, indica a qualidade do mel. Quanto menor o índice de HMF

encontrado (cor), maior será a qualidade do mel, pois com a formação do HMF, várias enzimas e vitaminas são destruídas. O nível de HMF pode se elevar devido ao aquecimento ou armazenamento inadequado (MEIRELES e CANÇADO, 2013).

No presente estudo o mel apresentou coloração negativa (não houve formação de cor), indicando que não houve aquecimento do mel, ou tempo prolongado de estocagem, bem como adição de xaropes de açúcares. Azeredo e damasceno, (1999) estudaram a produção HMF em mel pela incidência de luz e tempo de armazenamento. As análises revelaram que os méis estocados ao abrigo de luz tiveram insignificante produção HMF, quando comparado aos méis que sofreram incidência de luz natural. Contudo, este estudo revelou que após 365 dias até mesmo o mel protegido da luz sofreu reação e produção de HMF, caracterizando que o tempo de estocagem também pode afetar na qualidade do mel.

A prova de Lugol permite avaliar se o mel sofreu adição de amido e dextrina. A reação pode variar do vermelho violeta ao azul, sendo a coloração azul identificativo de fraude. No presente estudo o mel avaliado apresentou coloração vermelho tijolo, indicando que não houve fraude, caracterizando o mel como puro.

A diastase é o nome comum dado à enzima α -amilase, que tem por função digerir o amido (MARCHINI et al., 2000), proveniente principalmente das glândulas hipofaríngeas das abelhas, pode ser encontrada também, em baixa proporção nos grãos de pólen. O índice de diastase é utilizado para avaliar a qualidade do mel, fornecendo indicações sobre o grau de conservação e superaquecimento, o que comprometeria seriamente o produto (BARBOSA et al., 2014). Foi encontrado valor de 21,4, superior ao descrito pela portaria 207. Marchini et al., (2000) relataram valores de atividade diastásia (5,0 6,5 e 6,5) em mel cristalizado de origem floral silvestre, laranja e eucalipto, respectivamente.

Os resultados obtidos comprovam a qualidade do respectivo produto comercializado no sudoeste do Paraná.

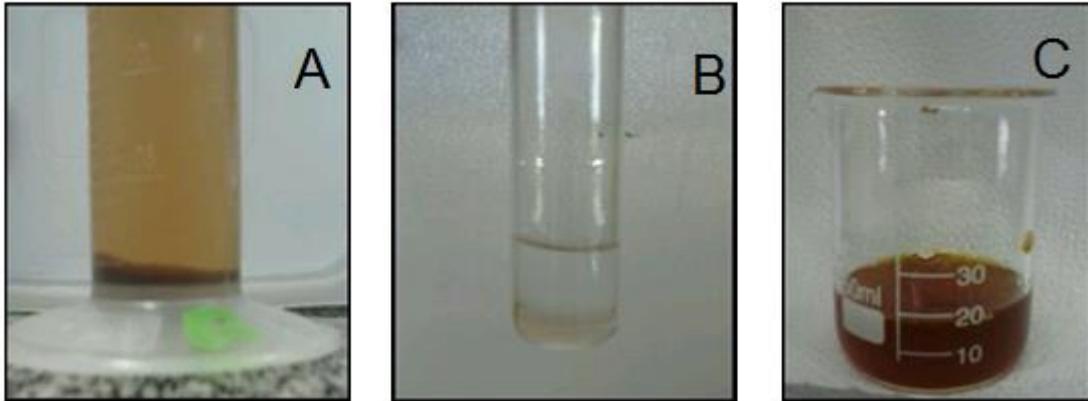


Figura 13: Teste de Lund (A), teste de Fiehe (B), teste de Lugol (C), respectivamente.
Fonte: Autoria própria.

As coordenadas CIE L^* , a^* , b^* para cor do mel foram L^* 34,16; a^* -1,42 e b^* 18,19. Nota-se que a amostra tende ao amarelo (b^*) e com baixa luminosidade (L^*).

Os valores de compostos fenólicos e antioxidantes estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos do mel de abelhas meliponas Jataí (*Tetragonisca angustula*).

Parâmetro	Fenólicos Totais (mg GAE/100g) [#]	Atividade Antioxidante		
		DPPH* ($\mu\text{mol TE/g}$)*	ABTS** ($\mu\text{mol TE/g}$)*	FRAP ($\mu\text{mol sulfato ferroso/g}$)*
Valores observados	64,6 \pm 5,97	2,63 \pm 0,12	3,33 \pm 0,17	6,77 \pm 0,59

[#]GAE: ácido gálico equivalente, ^{*}TE: trolox equivalente

Os compostos fenólicos são sintetizados no metabolismo especializado nos vegetais, e tem a função de defesa contra o ataque de pragas e/ou microrganismos, bem como resposta aos estresses causados por fatores edafoclimáticos. Contudo, no organismo humano apresentam propriedades de óxido-redução (BERTOLDI et al., 2012).

O mel avaliado apresentou apreciáveis conteúdos de compostos fenólicos totais (64,6 mg GAE/100g) e potencial antioxidante. Lira et al., (2014) avaliando méis de *T. angustula* observaram valor médio de compostos fenólicos totais de 103,64 mg GAE/100g, valor superior ao descrito neste trabalho. Bertoldi et al., (2012) estudaram méis de *Apis mellífera* provenientes de duas distintas fazendas (Nhumirim e Band'Alta), o valor médio de teor de fenólicos totais avaliado por estes, foi de

61,52 mg GAE/100g para fazenda Band'Alta e 222,03 mg GAE/100g na fazenda Nhumirim.

Pelo método de captura do radical cátion ABTS^{•+} foi verificada atividade anti-radicalar de 3,33 $\mu\text{mol TE/g}$ e pelo método DPPH[•] 2,63 $\mu\text{mol TE/g}$. O mel também apresentou potencial antioxidante de redução do íon férrico a ferroso (6,77 $\mu\text{mol sulfato ferroso eq./g}$).

O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e em substâncias com capacidade antioxidante pode contribuir para a proteção contra radicais livres, riscos de doenças cardiovasculares, proteção contra doenças degenerativas entre outros benefícios a saúde (CUNHA et al., 2016).

5.2 PARÂMETROS FERMENTATIVOS DO MELOMEL

O perfil fermentativo do mosto a base de mirtilo e mel de meliponas Jataí está demonstrado na Figura 14. A levedura empregada no processo demonstrou grande eficiência na conversão dos açúcares presentes no mosto a etanol. Pode ser verificado um perfil linear no consumo do substrato na produção de etanol, o que demonstra que a levedura estava adaptada ao mosto e as condições de processo, bem como apresentou efetiva capacidade fermentativa.

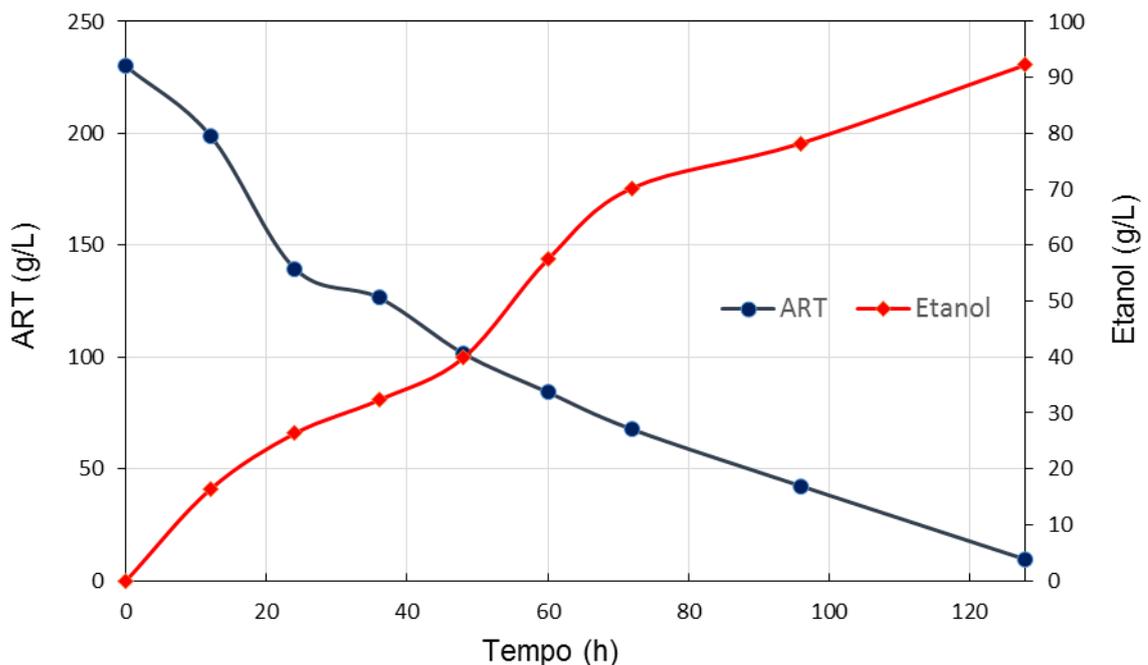


Figura 14: Concentração de açúcares redutores totais (ART) e etanol ao longo da fermentação alcoólica.

A fermentação foi finalizada em 128 horas de cultivo, quando foi verificada ausência de desprendimento de gás carbônico e estabilização no conteúdo de sólidos solúveis totais em 5 °Brix.

Na literatura são citados diferentes tempos de fermentação na produção de hidromel e fermentados a base de sucos de frutas. Cunha et al., (2016), produziram fermentado alcoólico de amora preta partindo de mosto com 16 °Brix e obtiveram produto com 9 °Brix após 36 horas de cultivo. Ilha et al., (2008), descreveram hidromel com menos de 2 °Brix de sólidos residuais após 86 horas de fermentação. Bortolini et al., (2001), por outro lado, avaliando a produção de fermentado alcoólico de mosto, composto por polpa de kiwi e sacarose comercial (18 °Brix iniciais) e descreveram um período de fermentação de 40 horas.

O tempo de fermentação pode variar bastante conforme as matérias primas utilizadas na elaboração do mosto e também em função da cepa microbiana utilizada. Ferraz, (2015) avaliou diferentes espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, onde a cepa *Saccharomyces cerevisiae bayanus* Pasteur Champagne apresentou melhor desempenho com menor tempo de fermentação.

No presente estudo a levedura foi capaz de consumir 96% do substrato e produzir 92,3 g/L de etanol (11,7 °GL) em 128 horas de cultivo conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros fermentativos da fermentação alcoólica.

Parâmetro	Valor observado
Produção final Etanol (Q_{exp})	92,3 ± 0,23 (g/L)
Rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)	0,42 ± 0,03 g/g
Produtividade Volumétrica em etanol (Q_P)	0,72 ± 0,05 g/L.h
Taxa global do consumo do substrato (Q_S)	1,72 ± 0,07 g/L.h
Eficiência da fermentação alcoólica (η)	82%

No final da fermentação foi verificado um rendimento em etanol de 0,42 g/g, produtividade volumétrica de 0,72 g/L.h, taxa de consumo do substrato de 1,72 g/L.h e elevada eficiência na fermentação alcoólica (82%). Comportamento similar foi reportado por Ferraz, (2015), os quais verificaram rendimento de 0,43 g/g, produtividade de 1,13 g/L.h e 83,6% de eficiência na produção de hidromel

produzido a partir de mosto com 30 °Brix, empregando a mesma levedura no processo.

Resultados similares de rendimento em etanol e eficiência da fermentação foram descritos por outros autores. Ilha et al., (2008) descreveram rendimento de 0,41 g/g e 81% de eficiência no processo de produção de hidromel de mel de abelha *A. mellifera*. Bortolini et al., (2001), encontraram valores de rendimento de 0,47 g/g e eficiência de 92,41% na fermentação alcoólica de mosto a base de kiwi.

Segtowick et al., (2013) obtiveram vinhos com graduação entre 10 e 11 °GL, partindo de mostos com 20 °Brix fermentados em temperatura ambiente. Ilha et al., (2008) também trabalhando em temperatura ambiente, com mosto com 21 °Brix obtiveram hidromel com 8 °GL.

Os valores de pH e acidez ao longo da fermentação, conforme demonstrados no gráfico da Figura 15, indicam que o processo fermentativo ocorreu de maneira asséptica sem contaminações como bactérias acéticas, lácticas ou propiônicas.

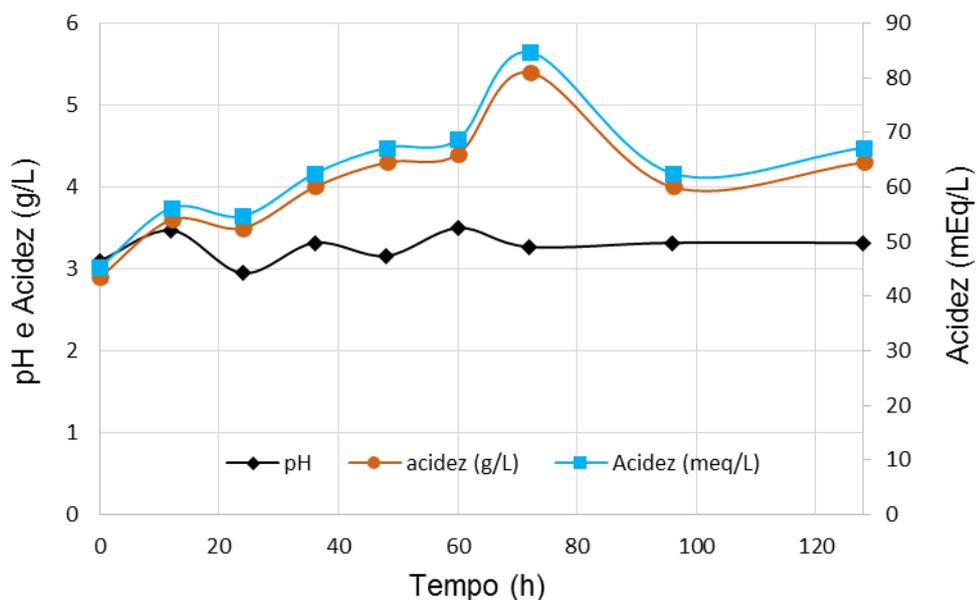


Figura 15: Perfil do pH e acidez ao longo da fermentação alcoólica.

O pH variou de 3,10 a 3,32 e a acidez entre 45,3 mEq ácido cítrico/L a 67,2 mEq ácido cítrico/L. Segtowick et al., (2013) elaboraram fermentados alcoólicos a partir de acerola, obtendo vinhos seco, semisseco e suave com valores de pH de 3,56, 3,58 e 3,63, respectivamente. O pH não é disciplinado pela legislação brasileira, entretanto, pode ser considerado um parâmetro de qualidade do produto e indicativo de adequada fermentação.

Com relação à acidez, a Instrução Normativa Portaria Nº 64, de 23 de Abril de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, indica que tanto hidroméis como fermentados de frutas, devem apresentar valor mínimo de 51 mEq/L e máximo de 130 mEq/L. Tal parâmetro condiciona a estabilidade biológica, inibindo microrganismos prejudiciais, a cor e as características gustativas dos vinhos (CHAVARRIA et al., 2011). A acidez variou de 45,3 mEq ácido cítrico/L no início da fermentação a 67,19 meq/L no produto final, estando portanto, em conformidade com a legislação. Valores próximos aos encontrados no presente trabalho foram descritos por Chavarria et al., (2011), os quais obtiveram acidez de 54 a 76 mEq/L em vinhos obtidos de mosto a base de uva.

O melomel de mirtilo apresentou ainda (Tabela 5) apreciáveis valores de compostos fenólicos e antioxidantes, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do melomel (obtido a partir de mel de abelhas meliponas Jataí e frutos de mirtilo).

Parâmetro	Fenólicos Totais (mg GAE/100mL)#	Atividade Antioxidante		
		DPPH* ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$)*	ABTS** ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$)*	FRAP ($\mu\text{mol sulfato ferroso}/100\text{mL}$)
Valores observados	54,12 \pm 013	63,44 \pm 14,11	184,29 \pm 17,0	818,76 \pm 1,28

#GAE: ácido gálico equivalente, *TE: trolox equivalente.

O melomel de mirtilo apresentou elevado conteúdo de compostos fenólicos totais (54,12 mg GAE/100mL) e potencial antioxidante. Pelo método de captura do radical cátion ABTS** foi verificada atividade anti-radicalar de 184,29 $\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$ e pelo método DPPH* 63,44 $\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$. O melomel também apresentou potencial antioxidante de redução do íon férrico a ferroso (818,76 $\mu\text{mol sulfato ferroso}/100\text{mL}$), demonstrando que o produto fermentado possui atividade de captura de radicais livres e potencial redutor.

5.3 PARÂMETROS FERMENTATIVOS DA OXIDAÇÃO

O perfil de produção de ácido acético e consumo de etanol ao longo da fermentação está demonstrado na Figura 16. As bactérias ácido-acéticas demonstraram grande eficiência na conversão do etanol a ácido acético.

No início da acetificação, o teor de ácido acético no melomel foi de 0,148 g/L. Durante as primeiras 125 horas de processo, verificou-se que não houve efetiva acetificação do mosto. Este comportamento pode ser devido ao fato de as bactérias estarem em fase de adaptação ao novo meio em que foram inoculadas (fase lag), uma vez que foram inicialmente cultivadas em meio GY, rico em nutrientes, porém diferente do mosto (melomel de mirtilo). O período de 24 horas em que o inóculo permaneceu em contato com o melomel na vinagreira a temperatura ambiente (pé-de-cuba) possivelmente não foi suficiente para a adaptação das células ao mosto.

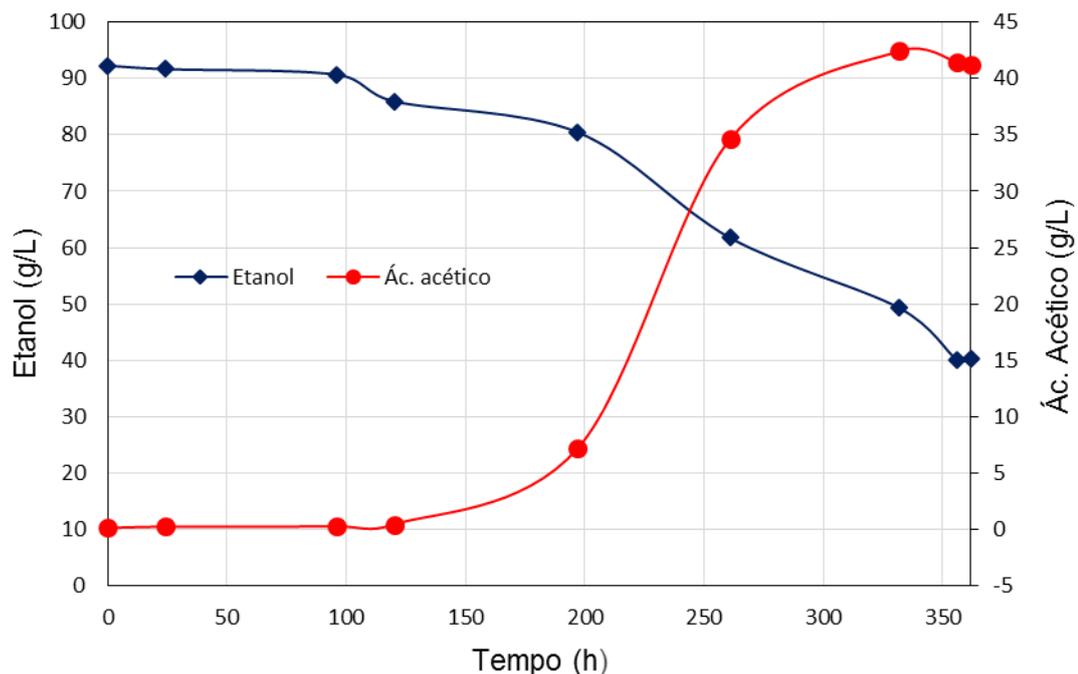


Figura 16: Perfil da produção ácido acético e consumo de etanol ao longo da fermentação acética.

Após a fase de adaptação, houve aumento considerável na acidez do meio, o que caracteriza a fase log de crescimento das bactérias acéticas, ou seja, estas bactérias já metabolicamente ativas iniciaram o processo de oxidação de forma efetiva. Este processo de conversão de etanol em ácido acético foi mantido até

332 horas, onde foi verificado teor de ácido acético de 42,4 g/L, valor este condizente com o estabelecido pela legislação brasileira. A partir deste período, houve redução para 41,2 g/L quando o processo foi encerrado.

Valores similares foram descritos por Araújo et al., (2012), os quais verificaram produção de ácido acético de 44,1 g/L em vinagre de laranja lima após 56 dias de processo (processo lento), empregando vinagre forte (sem pasteurização) como inóculo e recirculação diária até formação da “mãe do vinagre”.

O gráfico da Figura 17, demonstra a evolução do processo de acetificação do melomel de mirtilo, quanto aos parâmetros acidez e pH. O melomel apresentou pH de 3,28, o qual sofreu redução gradativa até o valor de 2,92, observado no produto final. Comportamento similar também foi reportado por Araújo et al., (2012), obtendo vinagre de laranja lima com pH 2,70. Marques et al., (2010) ao avaliar o pH de vinagre de maracujá, observaram valor de 2,65, já na amostra de vinagre de tangerina com milho, tais autores observaram valor de 3,54.

O perfil do conteúdo de ácido acético (Figura 16) ao longo do processo está condizente com o perfil da acidez titulável (Figura 17). De fato, a conversão de etanol a ácido acético se deu a partir de 125 horas e intensificou-se a partir de 175 horas. Ao final do processo, o vinagre obtido apresentou valor de 4,04 g/100mL de acidez titulável, estando em concordância com os padrões exigidos em legislação.

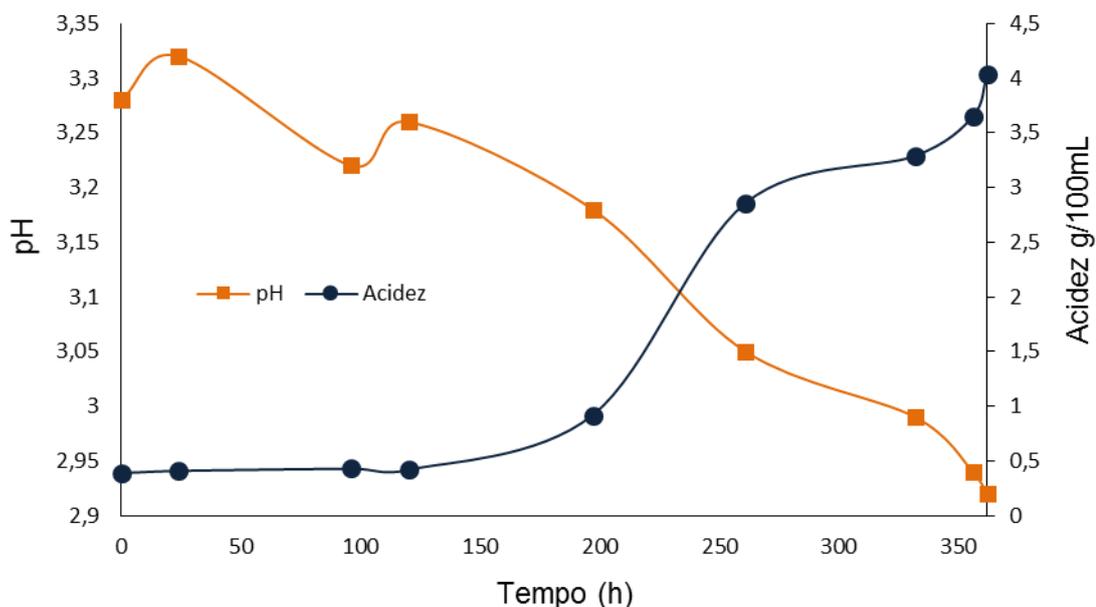


Figura 17: Comportamento do pH e acidez durante a acetificação do melomel de mirtilo.

É importante destacar que o aumento da acidez no vinagre ocorreu devido a liberação de ácido acético, o qual exerce grande influência na aceitação sensorial do produto, e está diretamente relacionado à acidez percebida sensorialmente. Com base nisto, a legislação busca determinar valor mínimo e máximo de ácido acético no vinagre para atender as necessidades do consumidor e manter a qualidade do produto (BRASIL, 2012; MARQUES et al., 2010).

A tabela 6 apresenta os valores dos parâmetros fermentativos avaliados no processo de acetificação.

Tabela 6: Parâmetros fermentativos avaliados no processo de acetificação.

Parâmetro do processo	Valor encontrado
Produção final de ácido (g/L)	41,22
Consumo global de etanol (g/L)	47,10
Rendimento em ácido acético (%)	53

Nota-se que o rendimento foi de 53%, tal valor está abaixo do encontrado por Ilha et al., (2000) que descrevem rendimentos variando de 91,2% a 92,17%. Tais autores elaboraram fermentado acético a partir de hidromel utilizando 5 ciclos sucessivos (batelada repetidas).

Bortoloni et al., (2001) apresentaram em seu trabalho, rendimentos de 81,81% a 93,24%. A demora para o início efetivo da acetificação pode afetar o rendimento, pois pode haver perdas de etanol por evaporação, como descrito por Rizzon e Menegazzo, (2006).

O presente trabalho demonstrou ainda (Tabela 7) que o vinagre obtido apresentou apreciáveis valores de compostos fenólicos e antioxidantes, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais no vinagre produzido.

Parâmetros	Fenólicos totais (mg GAE/100mL) [#]	Atividade antioxidante		
		DPPH* ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$)*	ABTS** ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$)*	FRAP ($\mu\text{mol de FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ equivalente/100mL)
Valores observados	47,62 \pm 0,06	46,53 \pm 0,1	190,97 \pm 18,89	872,28 \pm 12,83

[#]GAE: ácido gálico equivalente, *TE: trolox equivalente

Com relação ao conteúdo de fenólicos totais, o vinagre apresentou valor de 47,67 mg GAE/100mL, superior ao descrito por Cunha et al., (2016) em vinagre de amora-preta (entre 13,90 e 16,52 mg GAE/100mL). Marques et al., (2010) observaram que a presença do mel na formulação do vinagre de laranja com mel (43,27 mg GAE/100mL) contribuiu para o aumento do conteúdo de polifenóis totais, em relação ao vinagre de laranja (28,83 mg GAE/100mL), demonstrando que o mel possui valor nutricional e agrega qualidade ao produto.

Quanto à capacidade antioxidante, o produto demonstrou atividade de remoção dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] de 190,97 μ mol TE/100mL e 46,53 μ mol TE/100mL, respectivamente. Com relação ao poder redutor do íon férrico, foi observado valor de 872,28 μ mol de FeSO₄·7H₂O eq./100mL.

O perfil de compostos fenólicos totais e antioxidantes apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) após oxidação acética, exceto pelo método ABTS, conforme Tabela 8. Comparando os resultados de fenólicos totais e DPPH para melomel e vinagre, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) nos teores destes compostos, comportamento semelhante foi verificado por Cunha et al., (2016). Todavia, para o método FRAP foi verificado aumento no teor de antioxidantes, podendo ser atribuído a extração de compostos oriundos da vinagreira de grábia.

Tabela 8: Comparação dos teores de compostos fenólicos e antioxidantes antes e pós oxidação acética.

Parâmetros	Fenólicos totais (mg GAE/100mL) [#]	Atividade antioxidante		
		DPPH [•] (μ mol TE/100mL) [*]	ABTS ^{•+} (μ mol TE/100mL) [*]	FRAP (μ mol de FeSO ₄ ·7H ₂ O equivalente/100mL)
Melomel	54,12 \pm 0,13 ^a	63,43 \pm 14,10 ^a	184,29 \pm 16,99 ^a	818,76 \pm 1,28 ^b
Vinagre	47,62 \pm 0,06 ^b	46,53 \pm 0,1 ^b	190,97 \pm 18,89 ^a	872,28 \pm 12,83 ^a

[#]GAE: ácido gálico equivalente, ^{*}TE: trolox equivalente. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância de acordo com o Teste Tukey.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que foi possível a produção de um vinagre de mirtilo e mel através de um processo biotecnológico simples de acetificação, conduzido em vinagreira de madeira grápia. O produto obtido apresentou conteúdo de ácido acético e acidez de acordo com a legislação vigente, além de demonstrar ser um produto rico em compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante. A combinação de mel de abelhas meliponas e mirtilo produzidos na região sudoeste do Paraná na produção de vinagre pode ser uma alternativa promissora para aumentar a disponibilidade dos componentes benéficos presentes nas matérias-primas e agregar valor ao produto final.

7. REFERENCIAS

- ALMEIDA M. M. de; TAVARES D. P. S. de A.; ROCHA A. S.; OLIVEIRA L. de S. C.; SILVA F. L. H. da; MOTA J. C. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.
- ALVES R. M. de O.; CARVALHO C. A. L. de; SOUZA B. de A.; SODRÉ G. da S.; MARCHINI L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de melipona mandacaia smith (*hymenoptera: apidae*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(4): 644-650, out/dez. 2005.
- ANACLETO D. de A.; SOUZA B. de A.; MARCHINI L. C.; MORETI A. C. de C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, jul./set. 2009.
- ANTUNES L. E. C; GONÇALVES E. D; RISTOW N. C; CARPENEDO S; TREVISAN R. Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 43, n. 8, p. 1011-1015, ago. 2008.
- AQUARONE E.; LIMA U. de A.; BORZANI W. **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. 5 v. São Paulo: E. Blücher, 243 p, 1983.
- ARAÚJO L. T.; SILVA C. E. F.; ABUD A. K. S. Produção de vinagre de laranja ‘Lima’ em vinagreira artesanal. **SCIENTIA PLENA** v. 8, n. 12, 2012.
- AZEREDO M. A. A.; AZEREDO L. da C.; DAMASCENO J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidelis-RJ. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000100003>. Acesso em: 05 maio. 2016.
- BERTOLDI F. C.; GONZAGA L. V.; FETT R.; REIS V. D. A. Avaliação da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos totais de méis produzidos no pantanal. **Evidência**, Joaçaba, v. 12 n. 2, p. 155-164, julho/dezembro 2012.
- BARBOSA L. de S.; MACEDO J. L.; SILVA M. R. F.; MACHADO A. V. Estudo Bioquímico de Qualidade do Mel de Abelha Comercializado no Município de Caraúbas – RN, **Revista Verde Mossoró – RN**, v. 9, n. 2, p. 45 - 51, 2014.
- BAHIA. PORTARIA Nº 207 DE 21/11/2014. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero Melipona. **Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB)** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=277684>> Acesso em: 20/01/2016.
- BOBANY D. de. M.; PIMENTEL M.de. A. P.; MARTINS R. R. C.; NETTO B. A. de S.; TOLLA M. S. de. Atividade Antimicrobiana do Mel de Abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) em Cultivo de Microrganismos do Conduto Auditivo de Caninos

Domésticos (*Canis familiaris*). **Ciência Animal Brasil**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 441-446, jun. 2010.

BORTOLINI F.; SANT'ANNA E. S.; TORRES R. C. Comportamento das Fermentações Alcoólica e Acética de Sucos de Kiwi (*Actinidia deliciosa*); Composição dos Mostos e Métodos de Fermentação Acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21(2), p 236-243. 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Food Science and Technology**, França, v. 28, n. 01, p. 25-30, Jun. 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa 11**, de 20 de outubro de 2000, Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.

BRASIL. Instrução Normativa n. 64, de 23 de abril de 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo III, Regulamento Técnico para a Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Hidromel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 abr. 2008.

BRASIL. Instrução normativa nº 6, de 3 de abril de 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_23137023_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_6_DE_3_DE_ABRIL_DE_2012.aspx> Acesso em: 12 abril 2016.

BUDAK, H. N. GUZEL-SEYDIM, Z. B. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques, **Journal Science Food Agriculture**, New York, n. 90 v. 12, p. 2021-2026. 2010.

CHAGAS N. V. **Estudos de Parâmetros para Produção e Bebida Fermentada a partir do Mel**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química aplicada). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2009

CHAVARRIA G; SANTOS H. P; ZANUS M. C; MARODIN G. A. B; ZORZAN C. Cobertura Plástica Sobre o Vinhedo e suas Influências nas Características Físico-químicas do Mosto e do Vinho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 809-815, Set. 2011.

CRUZ D. de. O.; CAMPOS L. A. de. O. Polinização pro Abelhas em Cultivo Protegidos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 15, n. 1-4, p. 5-10, jan-dez. 2009.

CUNHA M. A. A. da; LIMA K. P. de; SANTOS V. A. Q.; HEINZ O. L.; SCHMIDT C. A. P. Blackberry Vinegar Produced By Successive Acetification Cycles: Production, Characterization And Bioactivity Parameters. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

FABICHAK I. **Abelhas Indígenas sem ferrão - Jataí**. NOBEL. 53 p. 1987.

FERNANDES D.; LOCATELLI G. O.; SCARTAZZINI L. S. Avaliação de diferentes estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração. **Evidência**, Joaçaba v. 9, n. 1-2, p. 29-42, janeiro/dezembro 2009.

FERRAZ O. F; **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo. 2015.

GAVA A. J.; SILVA C. A. B. da; FRIAS J. R. **Tecnologia de Alimentos – Princípios e Aplicações**. São Paulo - SP: Nobel, 511 p, 2009.

GOLDMEYER B; PENNA N. G; MELO Â; ROSA C. S. da. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 4, p. 980-987, Dezembro 2014.

GOMES T. M. da. C. **Produção de Hidromel: efeito das condições de fermentação**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) Escola Superior Agrária de Bragança, 2010.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. Paraná avança na regulamentação da produção de mel de abelhas sem ferrão. **Secretaria da Comunicação Social**, 08/04/2016. Disponível em: <<http://www.cidadao.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=88621&tit=Parana-avanca-na-regulamentacao-da-producao-de-mel-de-abelhas-sem-ferrao>> Acesso em: 20/05/2016.

ILHA E. C.; BERTOLDI F. C.; REIS V. D. A. dos; SANT'ANNA E. S. Rendimento e Eficiência da Fermentação Alcoólica na Produção de Hidromel. 14p. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pantanal**, ISSN 1517-1981; 82. Corumbá – MS, 2008

ILHA E. C.; SANT'ANNA E. S.; TÔRRES R. C. O.; PORTO A. C. S.; MEINERT E. M. Utilization of Bee (*Apis mellifera*) Honey for Vinegar Production at Laboratory Scale, **Acta Científica Venezolana**, p. 231–235, 2000

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KEMPKA A. P.; MANTOVANI G. Z. Produção de hidromel utilizando méis de diferentes qualidades. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 3, p. 273-281, 2013.

KUROISHI A. M.; QUEIROZ M. B.; ALMEIDA M. M. de; QUAST L. B. Avaliação da cristalização de mel utilizando parâmetros de cor e atividade de água, **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 84-91, jan./mar. 2012.

LIRA A. F.; SOUSA J. P. L. de M.; LORENZON M. C. A.; VIANNA C. A. F. J.; CASTRO R. N. Estudo comparativo do mel de *apis mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.169-178, 2014.

LOPES M.; FERREIRA J. B.; SANTOS G. dos. **Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível**. *Agriculturas*, v. 2, n. 4, dezembro 2005.

MACHADO, B. A. S.; CRUZ, L. S.; NUNES, S. B.; GUEZ, M. A. U.; PADILHA, F.F. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC** – São Cristóvão/SE, v. 2, n. 3, p. 221-235 2012.

MARCHINI L. C.; RODRIGUES A. C. L.; MORETI A. C. C. C. Hmf (hidroximetilfurfural) e diastase de méis submetidos a dissolução de cristais por aquecimento. **Boletim de Indústria Animal**, Odessa, v. 57, n. 1, p. 85-91, 2000.

MARQUES F. P. P.; SPINOSA W.; FERNANDES K. F.; CASTRO C. F. S.; CALIARI M. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, p. 119-126, maio 2010.

MATTIETTO R. de A.; LIMA F. C. C. de; VENTURIERI G. C.; ARAÚJO Á. A. de. **Tecnologia para Obtenção Artesanal de Hidromel do Tipo Doce**. ISSN 1517-2244. Belém - PA, 2006.

MEIRELES S.; CANÇADO I. A. C. Mel: parâmetros de qualidade e suas implicações para a saúde, *SynThesis Revista Digital FAPAM*, Pará de Minas, v. 4, n. 4, p 207-219, abr. 2013.

MILLER G. L.; Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n.3, v.31, p.426-428, Mar.1959.

MORAES J. O. de; PERTUZATTI P. B.; CORRÊA F. V.; SALAS-MELLADO M. de L. M. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(supl.) p. 18-22, ago. 2007

NETO P. C. de. O.; JERONIMO K. R.; LIRA T. K. B.; FLORÊNCIO I. M.; FLORENTINO E. R. Obtenção de Hidromel Tipo Doce. **I Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia UEPB**, Campina Grande – PB, Novembro de 2012.

PIRES E. A.; FERREIRA M. A.; SILVA S. M. P. C. da.; SANTOS F. L. Estudo Prospectivo do Hidromel sob o Enfoque de Documento de Patentes. **SIMTEC**, Aracaju - SE, v. 1, n. 1, p. 404-413, 2013.

RIVALDI J. D.; SILVA M. M.; COELHO T. C.; OLIVEIRA C. T. de. Caracterização e perfil sensorial de hidromel produzido por *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888. **Brazilian Journal Food Technology**, VII BMCFB, junho 2009.

RIZZON L.; MENEGUZZO J. A., Sistema de Produção de Vinagres, EMBRAPA 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre>> Acesso em: 06/06/2015.

RUFINO M. S. M.; ALVES R. E.; BRITO E. S.; MORAIS S. M.; SAMPAIO C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de redução do Ferro – FRAP. EMBRAPA, **Comunicado Técnico, on line** Fortaleza. 2006.

RUFINO M. S. M.; ALVES R. E.; BRITO E. S.; MORAIS S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ J.; SAURA-CALIXTO F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. EMBRAPA, **Comunicado Técnico, on line** Fortaleza. 2007.

SCHRAMM K. **The Compleat Meadmaker**. Brewers Publications ISBN-10: 0937381802 ISBN-13: 978-0937381809, p. 216, 2003

SEGTOEWICK E. C. S.; BRUNELLI L. T.; VENTURINI FILHO W. G. Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola. **Brazilian journal food technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 147-154, abr/jun. 2013.

SILVA W. P.; PAZ J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. Copyright©. **ESFA**, jul/set 2012.

SINGLETON V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, **Revista de Nutrição**, San Diego, v. 299, n. 15, p. 152-178, 1999.

VILLAS-BÔAS Jerônimo. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. Ed. 1, ISP, p. 96, Brasília DF, 2012.

VILLAS-BOAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 82, p. 6-16, 2005.