UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL A PARTIR DO MEL DE APICULTURA DO SERTÃO PERNAMBUCANO

HENRI ADSO FERREIRA MEDEIROS

Recife/PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL A PARTIR DO MEL DA APICULTURA DO SERTÃO PERNAMBUCANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.ª Drª Luciana Leite de Andrade Lima Arruda.

Coorientadora: Prof.ª Drª Andrelina Maria Pinheiro Santos.

RECIFE/PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M488a Medeiros, Henri Adso Ferreira
AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROMEL A PARTIR DO MEL DE APICULTURA DO SERTÃO PERNAMBUCANO / Henri Adso Ferreira Medeiros. - 2023.
107 f. : il.

Orientador: Luciana Leite de Andrade Lima Arruda.
Coorientador: Andrelina Maria Pinheiro. Santos..
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2023.

1. parâmetros fermentativos; . 2. fermentação. 3. não-Saccharomyces. 4. otimização. 5. Saccharomyces. I. Arruda, Luciana Leite de Andrade Lima, orient. II. Santos., Andrelina Maria Pinheiro., coorient. III. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Avaliação de leveduras para produção de hidromel a partir do mel da apicultura do Sertão Pernambucano

Por Henri Adso Ferreira Medeiros

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 13/06/2023 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof.ª Dr.ª Luciana Leite de Andrade Lima Arruda (Orientadora)

_____

Prof.ª. Dr.ª Eliana Setsuko Kamimura – USP

_____

Prof.ª Dr.ª Sharline Florentino De Melo Santos - UFPB

Dedico este trabalho a todos aqueles que, não apenas estiveram ao meu lado durante esse processo, como também acreditaram na minha capacidade. Obrigado!

AGRADECIMENTO

Agradeço ao Cosmo por me dar força e saúde nessa empreitada, mesmo com tantos percalços e novas descobertas.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À Maria Luiza, que me aturou e incentivou durante esse processo, sempre acreditando no meu potencial.

As minhas mentoras na orientação e na coorientação dessa pesquisa: Professora Luciana Leite de Andrade Lima Arruda e Professora Andrelina Maria Pinheiro Santos, por servirem de Norte e inspiração, além de compreenderem o meu ritmo e estarem sempre prontas para o suporte necessário.

A técnica de laboratório, Marcia dos Santos, por sempre ser prestativa e companheira, quase uma mãe no laboratório.

Agradeço a UFRPE e UFPE, seu corpo docente e colaboradores pelo possível vislumbre de um horizonte superior e apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao professor Marcos Antônio de Morais Junior pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa “Seleção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de hidromel e cachaça a partir do mel da apicultura e meliponicultura”

A FACEPE por ter apoiado e financiado essa pesquisa sob o edital: BCT-0248-2.12/21.

“Do lado de fora, olhando para dentro, você nunca poderá entendê-lo. Do lado de dentro, olhando para fora, você jamais conseguirá explicá-lo. Isso é autismo.”

Autism Topics

RESUMO

A indústria meleira é uma atividade econômica desenvolvida no Sertão Pernambucano e o desenvolvimento de produtos à base de mel pode ser uma importante alternativa para o escoamento da produção e ao mesmo tempo uma interessante forma de agregar valor ao produto. O hidromel é uma bebida fermentada obtida pela diluição do mel em água com adição de nutrientes e leveduras. Esta bebida é bastante valorizada no mercado externo, e pode ser uma nova forma de rentabilizar e agregar valor ao mel produzido no estado, valorizando a produção local. O Brasil se encontra entre os principais exportadores de mel *in natura*, isso indica que o país pode vir a se tornar um forte competidor no mercado do hidromel. O presente estudo tem por objetivo investigar o processo de fermentação alcoólica do mel, com diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, produzir e avaliar o hidromel fresco. Os méis, de apicultura, para o desenvolvimento do estudo foram adquiridos de duas cooperativas do Sertão Pernambucano, das cidades de Triunfo e Serra Talhada. O produto foi caracterizado por meio de análises físico-químicas: concentração de sólidos solúveis, pH, açúcares redutores por DNS, perfil fenólico e viabilidade celular. Dessa forma, o presente estudo avaliou diferentes cepas de leveduras, 7 (sete) *Saccharomyces* e 6 (seis) não-*Saccharomyces*, bem como a cinética fermentativa delas na produção de hidromel, buscando encontrar leveduras que submetidas a condições fermentativas adequadas sejam capazes de gerar hidromel, em conformidade com o preconizado pela legislação brasileira, a partir de méis de apicultura do Sertão Pernambucano. De maneira geral, esse estudo aponta a importância da escolha da cepa na produção de hidromel, pois mesmo cepas da mesma espécie, apresentaram perfis fermentativos e fenólicos distintos, o que vai impactar diretamente na produção de um hidromel único.

Palavras-chave: bioma caatinga; não-*Saccharomyces;* otimização; fermentação; parâmetros fermentativos; *Saccharomyces.*

ABSTRACT

The honey industry is an economic activity developed in *Sertão Pernambucano*. The development of honey-based products can be an important alternative for the production flow and an interesting way to add value to the product. Mead is a fermented drink obtained by diluting honey in water with the addition of nutrients and yeast. This drink is highly valued in the foreign market and can be a new way to monetize and add value to the honey produced in the state, valuing local production. Brazil is among the main exporters of honey in nature, which indicates that the country may become a strong competitor in the mead market. The present study aims to investigate the process of alcoholic fermentation of honey, with different strains of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts, to produce and evaluate fresh mead. Beekeeping honey for the development of the study was purchased from two cooperatives in the *Sertão Pernambucano*, in the cities of *Triunfo* and *Serra Talhada*. The product was characterized by physical-chemical analyses: concentration of soluble solids, pH, reducing sugars by DNS, phenolic profile, and cell viability. Thus, the present study evaluated different strains of yeast, 7 (seven) Saccharomyces and 6 (six) non-Saccharomyces, as well as their fermentative kinetics in the production of mead, seeking to find yeasts that, submitted to adequate fermentative conditions, are capable of generating mead, following what is recommended by Brazilian legislation, from beekeeping honey from the *Sertão Pernambucano*. In general, this study points to the importance of choosing the strain in the production of mead, as even strains of the same species have different fermentative and phenolic profiles, which will directly impact the production of a unique mead.

Keywords: caatinga biome; fermentation optimization; fermentation parameters; non-*Saccharomyces; Saccharomyces.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Saccharomyces cerevisiae*.....25

Figura 2 – Morfologia celular de *Saccharomyces cerevisiae* var*. diastaticus*...27

Figura 3 – Morfologia celular de *Saccharomyces pastorianus*.....29

Figura 4 - Representação das vias de utilização de carbono e azoto em *Bretanomyces bruxellensis* sob condições aeróbias e anaeróbias.....30

Figura 5 – *Brettanomyces*.....31

Figura 6 - Benefícios da *Wickerhamomyces anomalus* na produção de vinho.....32

Figura 7 - *Wickerhamomyces anomalus*.....32

Figura 8 – (A) *Saccharomyces cerevisiae* (B) *Lachancea thermotolerans*.....37

Figura 9 - Transformação de glicose em etanol.....41

Figura 10 - Fluxograma básico da produção de hidromel.....47

Figura 11 – Esquematização de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....49

Figura 12 – Exemplo de Cromatograma obtido em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....50

Figura 13 - Tanque de fermentação (1,5L) desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos (UFPE/Brasil) 54

ARTIGO

Figura 1 - Tanque de fermentação de bancada (1.5L) desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos (UFPE/Brasil) 83

Figura 2 - Perfil cinético de fermentação das sete cepas de *Saccharomyces* estudadas: (A) análise da concentração de etanol (v/v) em função do tempo. (B) gráfico representando a concentração de açúcar (g/100mL) em função do tempo. (C) viabilidade celular (%) em função do tempo.....89

Figura 3 - Perfil cinético de fermentação das seis cepas não-*Saccharomyces* estudadas: (A) análise da concentração de etanol (v/v) em função do tempo. (B) gráfico representando a concentração de açúcar (g/100mL) em função do tempo. (C) viabilidade celular (%) em função do tempo.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de mel de apicultura das Regiões Nordeste e Sul do Brasil em 2021.....20

Tabela 2 - Requisitos físico-químicos do hidromel de acordo com a IN nº34.....39

Tabela 3 - Tipos de hidroméis com base nos insumos adicionados ao mosto e envelhecimento.....39

Tabela 4 – Relação entre aminoácidos e álcoois superiores formados deles.....43

Tabela 5 - Ácidos fenólicos e seus subprodutos e limiar de concentração.....46

Tabela 6 - Leveduras *Saccharomyces* pré-selecionadas para o estudo.....52

Tabela 7 - Leveduras não-*Saccharomyces* pré-selecionadas para o estudo...53

ARTIGO

Tabela 1 - *Saccharomyces* utilizada para o estudo cinético.....81

Tabela 2 - Não-*Saccharomyces* usadas no estudo cinético.....82

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da matéria-prima e hidroméis obtidos de cada levedura, após 216h de fermentação.....86

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da matéria-prima e hidroméis obtidos de cada levedura, após 372h de fermentação.....87

Tabela 5 – Perfil fenólico de hidroméis fermentados por diferentes leveduras.94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°Brix – grau Brix

°C – graus Celsius

°GL -grau Lussac

ABV – Alcohol by Volume

Acetil-CoA – acetilcoenzima A

ATP – adenosina trifosfato

cel/mL – células por mililitro

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CO_2 – gás carbônico

DNS – ácido 3,5 - dinitrosalicílico

DPPH – determinação do potencial antioxidante

FM – Fase móvel

FE – Fase estacionária

g/L – Grama por litro

GRAS - Generally Recognized As Safe

H+ – íon de hidrogênio

HPLC - High performance liquid chromatograph

L – Litro

L/L – Litro por litro

LDL – *low density lipoprotein*

LDN – Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas

LT - *Lachancea thermotolerans*

mEq/L – miliequivalentes por litro

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/L – miligramas por litro

mL – mililitros

mm – milímetro

nm – nanômetro

p/p – peso por peso

pH – potencial Hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

Pma1 – Atpase de membrana plasmática

SM – Solução mãe

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

v/v – volume por volume

WA - *Wickerhamomyces anomalus*

YAN - nitrogênio assimilável por levedura

YPD – meio de cultura de levedura

ΔT – variação de temperatura

µm - micrómetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. PROBLEMA E PESQUISA E HIPÓTESE 17
3. OBJETIVOS 18
3.1. OBJETIVO GERAL 18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
4. REVISÃO DE LITERATURA 19
4.1 MEL 19
4.2 LEVEDURAS 21
4.3 HIDROMEL 38
4.4 FERMENTAÇÃO 40
4.4.1 Bioquímica 40
4.4.2 Compostos secundários obtidos pela fermentação 42
4.4.3 Fermentação de hidromel 46
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 48
5 MATERIAL E MÉTODOS 51
5.1 MATERIAIS 51
5.1.1 Matérias-primas para o hidromel 51
5.2 MÉTODOS 53
5.2.1 Produção do hidromel 53
5.2.2 Análises microbiológicas e físico-químicas 54
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56
6 REFERÊNCIAS 57
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 79
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 107

1. INTRODUÇÃO

As variações climáticas determinam a dinâmica da vegetação, favorecendo a diversidade e qualidade do mel (GALVINCIO *et al*., 2016). O estado de Pernambuco é caracterizado pelos climas: tropical úmido e semiárido, tais condições climáticas exercem influência primordial nas características organolépticas do mel (VIDAL, 2017).

A mesorregião denominada Sertão, onde estão localizadas as cidades de Serra Talhada e Triunfo, é um dos principais destaques na produção melífera pernambucana (IBGE, 2021). Essa produção encontra-se associada a diversidade vegetal do bioma caatinga, vegetação natural única no mundo, valorando ainda mais esse produto. Além disso, nessa região do sertão pernambucano existe uma baixa utilização de agrotóxicos, o que diminui a absorção desses produtos pelas abelhas (LEÃO; MOUTINHO; XAVIER, 2012).

A produção de hidromel vem sendo explorada, como alternativa à comercialização *in natura* do mel, por seu valor agregado. Considerada uma das bebidas mais antigas do mundo, teve seu consumo em épocas mais antigas de forma generalizada, porém com o passar do tempo, foi perdendo espaço e vindo a ser substituído por outras bebidas (SILVA, 2016).

De maneira geral, a produção comercial de hidromel utiliza culturas *starters*, que são leveduras disponíveis comercialmente, nas formas congelada ou liofilizada, e que são selecionadas de acordo com a finalidade do uso. Essas leveduras, são responsáveis por metabolizarem os açúcares redutores presentes no mel e outros aditivos, a depender do tipo de hidromel que está sendo produzido, gerando etanol e dióxido de carbono como principais produtos da etapa de fermentação (CHEN *et al*., 2013; FERRAZ, 2015; IGLESIAS *et al*., 2014).

As leveduras, não são apenas responsáveis pelo teor alcoólico para a bebida, elas são de suma importância nas características organolépticas apresentadas no hidromel. Essa influência é fruto da interação dos produtos gerados no metabolismo secundário do microrganismo (GUERRA, 2010).

Diversas cepas de leveduras estão disponíveis para a fermentação do hidromel, contudo, comercialmente, as mais viáveis são as cepas de *Saccharomyces*, também utilizadas na produção de cervejeira e vinífera

(SCHULLER & CASAL,2005). Apesar de apresentar excelente tolerância às altas concentrações de açúcares do mosto de mel e capacidade de crescimento em anaerobiose, nem sempre as cepas de *Saccharomyces* são utilizadas na produção de hidromel. Esse fato está ligado à diferença de composição de açúcares do mel e da uva, o que leva os produtores de hidromel a considerar que ela não renda bons produtos (CHEN *et al*., 2016; IGLESIAS *et al*. 2014).

Contudo o produto perde muito do seu teor "único", em detrimento da eficiência, em especial quando comparado com as bebidas fermentadas por leveduras selvagens (PUERTAS *et al*., 2017). Uma alternativa a essa padronização é a utilização de leveduras que não sejam da espécie *Saccharomyces*, pois elas conseguem aumentar a complexidade aromática, o que eleva a qualidade do produto (CHEN *et al*., 2013; LI e SUN, 2019; PUERTAS *et al*., 2017; SUN *et al*., 2022). Porém apesar de trazer essa melhoria na qualidade e acabar agregando valor ao produto, essas leveduras apresentam uma tolerância ao etanol muito baixa, além de uma capacidade fermentativa reduzida e algumas características organolépticas indesejadas, de tal maneira que se torna inviável a utilização de qualquer não-*Saccharomyces* para a fermentação de hidroméis. Contudo, há algumas cepas dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces e Torulaspora*, que apresentaram potencial fermentativo em cervejas e vinhos (TATARIDIS *et al*., 2013).

Nos estudos de literatura que utilizaram leveduras *não-Saccharomyces* para produzir hidromel, poucos materiais de referência são encontrados em bancos de dados como Scielo, Portal de periódicos da CAPES, *Web of science*, *Elsevier* e *Google Scholar* foram consultados, buscando as palavras: "mead", "yeast", "brewing" e "non-*Saccharomyces*". Obteve-se um total de 1410 resultados potenciais, compreendidos no período de 2015 a 2022, dos quais foram selecionados um total de dezoito artigos, por meio da leitura de seus títulos e resumos disponíveis, após a leitura e análise do artigo na íntegra, esse número foi reduzido para 8 publicações. O que demonstra a contribuição desta pesquisa sobre a utilização de leveduras não convencionais para a produção de hidromel.

Diante do exposto, esse estudo tem como objetivo selecionar leveduras capazes de produzir hidromel com base em méis de apicultura do Sertão Pernambucano.

2. PROBLEMA E PESQUISA E HIPÓTESE

É possível que leveduras em condições fermentativas adequadas sejam capazes de gerar hidromel, em conformidade com o preconizado pela legislação brasileira, proveniente de méis de apicultura e meliponicultura do Sertão Pernambucano?

H0: Leveduras submetidas a condições fermentativas adequadas não são capazes de gerar hidromel, em conformidade com o preconizado pela legislação brasileira, a partir de méis de apicultura e meliponicultura do Sertão Pernambucano.

H1: Leveduras submetidas a condições fermentativas adequadas são capazes de gerar hidromel, em conformidade com o preconizado pela legislação brasileira, a partir de méis de apicultura e meliponicultura do Sertão Pernambucano.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de leveduras quanto a produção de hidromel com base em méis de apicultura do Sertão Pernambucano.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética fermentativa de leveduras em méis de apicultura provenientes do Sertão Pernambucano.
- Analisar a possibilidade de leveduras gerarem características diferentes nos hidroméis produzidos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, serão abordados os principais temas relativos ao desenvolvimento do estudo, tais como o mel, as espécies de leveduras utilizadas na dissertação, o hidromel, o processo de fermentação e seus compostos secundários, bem como a cromatografia líquida de alta eficiência.

4.1 MEL

Mel é o produto alimentar de origem animal, produzido por abelhas melíferas, com substâncias próprias que é maturado nos favos da colmeia (BRASIL, 2017). A modificação do material recolhido pelas abelhas, que transformar-se-á em mel, é iniciado logo após a colheita na vesícula melífera das abelhas coletoras. Após isso uma classe de abelhas, chamada de operárias, fica responsável por preencher os favos e fechá-los com uma película de cera, para então ocorrer a transformação em mel, por meio da desidratação e inversão de açúcares (GARCIA-CRUZ *et al*., 2009). Após essa transformação é obtido o mel, um produto natural com inúmeras aplicações, seja na indústria alimentar, cosmética ou medicinal (JEFFREY e ECHAZARRETA, 1996; SHARQUIE *et al*., 2004; SHEIKH et al., 1995; SILVA *et al*., 2008; SWELLAM *et al*., 2003;).

Essa versatilidade do mel é possível graças a sua composição, tendo como principal os carboidratos, acima de 65% (CRANE, 1985, BRASIL, 2000). Também se encontra água, 17%-20%, alguns aminoácidos em contagem quase nula, 0,05% e minerais em baixas quantidades, entre 0,02% e 0,45%, outros componentes também são presentes como: compostos aromáticos e vitaminas (BOGDANOV, 2009).

A produção nacional apresentou uma ascensão entre os anos de 2020 e 2021, com um aumento de 6,4% na produção, alcançando o total de 55,8 mil toneladas, o que implica em R$ 854,4 milhões, um aumento de 34,8% no faturamento em relação ao ano anterior (SUARESSIG, 2023). Dentro do Brasil existem duas regiões que se destacam quanto à produção de mel (Tabela 1), a primeira é a região Sul, com a maior produção (IBGE, 2021), favorecida em especial pela colonização europeia que acabou dando todo o aporte técnico necessário (BARROS, 2005). Já a outra que merece destaque é a região Nordeste que vem tendo seu espaço produtivo aumentada consecutivamente e

pelas suas condições de produção bem favoráveis (IBGE, 2021). E quando se fala de crescimento de produção no Nordeste, o estado de Pernambuco vem se destacando, não pelo volume produzido, aproximadamente 1,4 toneladas anual, o que coloca o estado em 5º da região Nordeste e em 10º do Brasil, de acordo com o IBGE (2021), mas pelo seu ritmo de crescimento.

Tabela 1 - Produção de mel de apicultura das Regiões Nordeste e Sul do Brasil em 2021.

Estado	**Produção de mel em 2021**	
	R$	**Kg**
Região Nordeste		
Maranhão	38.595	2522,55
Piauí	99.392	6496,21
Ceará	57.579	3763,33
Rio Grande do Norte	11.508	752,16
Paraíba	5.535	361,76
Pernambuco	21.195	1385,29
Alagoas	11.112	726,27
Sergipe	2.107	137,71
Bahia	60.492	3.953,73
Total	307.515	20.099
Região Sul		
Paraná	123.683	8.083,86
Santa Catarina	67.261	4.396,14
Rio Grande do Sul	131.492	8.594,25
TOTAL	322.436	21.074,25

Fonte: adaptado de IBGE (2021).

Pelas características de clima, o estado é caracterizado pelos climas tropical úmido e semiárido, e flora de Pernambuco o insere de maneira competitiva no mercado meleiro, uma vez que, tais condições edafoclimáticas exercem influência primordial nas características organolépticas do mel (VIDAL, 2017), sendo que as variações climáticas vão determinar a dinâmica da vegetação local (GALVINCIO *et al*., 2016).

Outro ponto importante que se destaca em Pernambuco é a prática da apicultura, criação racional de abelhas de ferrão, e a meliponicultura, criação racional de abelhas nativas sem ferrão (GOMES *et al*. 2017), presentes em todo o território estadual. A mesorregião denominada Sertão, onde estão localizadas as cidades de Serra Talhada e Triunfo, é um dos principais destaques na

produção melífera pernambucana (IBGE, 2021). Essa importância ganha ainda mais destaque quando é analisada a diversidade vegetal local, com a caatinga, vegetação natural, valorando ainda mais esse produto. Além disso a absorção de pesticidas pelas abelhas é bem menor, quando comparada com outras regiões, pois o uso de pesticida é baixo.

4.2 LEVEDURAS

De maneira geral, ao produzir-se hidromel, utilizam-se culturas *starters*, que são leveduras disponíveis comercialmente, especialmente nas formas congelada ou liofilizada, e que são selecionadas de acordo com a finalidade do uso. Tal escolha é feita, pois uma fermentação espontânea, poderia gerar produtos de qualidade inferior e não padronizada, podendo chegar a ser insalubre para o consumidor (VEDOVATTO *et al*., 2019). Essas leveduras, são responsáveis por metabolizarem os açúcares presentes no mel e outros aditivos, a depender do tipo de hidromel que está sendo produzido, e gerando etanol e dióxido de carbono como principais produtos dessa ação, também chamada de fermentação (CHEN *et al*., 2013; FERRAZ, 2015; IGLESIAS *et al*., 2014).

As leveduras, não são apenas responsáveis por trazer o teor alcoólico para a bebida, elas são de suma importância nas características organolépticas apresentadas no hidromel. Essa influência é fruto da interação dos produtos gerados no metabolismo secundário do microrganismo (GUERRA, 2010).

Diversas cepas de leveduras estão disponíveis para a fermentação do hidromel, contudo, comercialmente, as mais viáveis são as cepas de *Saccharomyces*, também utilizadas na produção de cervejeira e vinífera (SCHULLER & CASAL,2005). Apesar de apresentar excelente tolerância às altas concentrações de açúcares do mosto de mel e capacidade de crescimento em anaerobiose, nem sempre as cepas de *Saccharomyces* são utilizadas na produção de hidromel. Esse fato está ligado à diferença de composição de açúcares do mel e da uva, o que leva os produtores de hidromel a considerar que ela não renda bons produtos (CHEN *et al*., 2016; IGLESIAS *et al*. 2014).

Contudo o produto perde muito do seu teor “único”, em detrimento da eficiência, em especial quando comparado com as bebidas fermentadas por leveduras selvagens (PUERTAS *et al*., 2017). Uma alternativa a essa padronização é a utilização de leveduras que não sejam da espécie

Saccharomyces, pois elas conseguem aumentar a complexidade aromática, o que eleva a qualidade do produto (CHEN *et al*., 2013; LI e SUN, 2019; PUERTAS *et al*., 2017; SUN *et al*., 2022). Porém apesar de trazer essa melhoria na qualidade e acabar agregando valor ao produto, essas leveduras apresentam uma tolerância ao etanol muito baixa, além de uma capacidade fermentativa reduzida e algumas características organolépticas indesejadas, de tal maneira que se torna inviável a utilização de qualquer não-*Saccharomyces* para a fermentação de hidroméis. Contudo, há algumas cepas dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces e Torulaspora*, que apresentaram potencial fermentativo em cervejas e vinhos (TATARIDIS *et al*., 2013).

Um dos pontos importantes e necessários das leveduras utilizadas para a fermentação alcoólica, é a sua capacidade de suportar o etanol, produto da fermentação alcoólica. Durante o processo fermentativo ocorre o aumento gradual da concentração de etanol no meio no qual a levedura se encontra, até o momento que atinge concentração que inativa ou autolisa a levedura, cessando o processo fermentativo. Dessa maneira, uma alta tolerância alcoólica implica em maior produção de álcool no mosto. Essa tolerância está ligada direta ou indiretamente a fatores como: componentes genéticos da levedura, toxicidade do etanol, influências do ambiente físico, composição do mosto, bem como a condição fisiológica da levedura (BOULTON e QUAIN, 2001).

Na primeira etapa da fermentação, conhecida como fase *lag,* latente ou ainda, fase de adaptação, as células de levedura utilizam açúcar e outros nutrientes, especialmente nitrogênio, para obter energia e iniciar o crescimento celular, ao passo que utilizam esses substratos para manter a sua sobrevivência nas novas condições ambientais (ZAMORA, 2009).

Após a adaptação, a levedura entra na fase de crescimento exponencial, também chamada de tumultuosa, é considerada a etapa principal no qual ocorre a intensa produção de etanol e desprendimento de CO_2, nesse momento a levedura começa a se replicar a uma taxa elevada que é limitada em grande parte pela concentração de nitrogênio (VARELA; PIZARRO e AGOSIN,2004). Durante esse mesmo período de crescimento, o oxigênio dissolvido no meio fermentativo é utilizado pela levedura na produção do principal esterol, o ergosterol, e ácidos graxos insaturados que serão incorporados ao diacilglicerol

(DAG), o precursor de todos os fosfolipídios que compõem a membrana celular de levedura (ZAMORA, 2009).

Após a exaustão do nitrogênio disponível, as leveduras começam a transitar para a fase estacionária, momento no qual a população de células de levedura atinge sua maior densidade. Durante o metabolismo da fase estacionária inicial, boa parte dos açúcares fermentáveis são convertidos em etanol e a viabilidade celular permanece relativamente alta, porém é perceptível uma diminuição no seu ritmo fermentativo (COLEMAN, FISH e BLOCK,2007).

A concentração de açúcar começa a decair, enquanto os teores de etanol aumentam, conforme a concentração de açúcar continua a cair, com uma certa estabilidade de células viáveis, até o ponto em que o açúcar é exaurido do meio, a partir desse instante as leveduras começam a morrer, havendo maior concentração de subprodutos, caracterizada pela menor liberação de CO_2 e menor temperatura (CARVALHO e SATO, 2001; HENDERSON e BLOCK, 2014).

Casey e Ingledew (1986) defendem que apesar de haver uma redução significativa no desempenho fermentativo em concentrações de etanol a partir de 10% (peso/volume) é apenas com 15% é que ocorrem as desnaturações das enzimas glicolíticas. Além disso, estudo publicado por Rowe (1992), diz que a bicamada membranosa da célula tem sua fluidez diretamente ligada à concentração de etanol, podendo chegar a uma perda próxima a 1/3 de sua espessura. Essa redução provocada pelo álcool acaba gerando uma saída de proteínas agregadas e alterações na atividade das membranas proteicas (HENDERSON e BLOCK, 2014).

Por fim essa exposição, da membrana plasmática a meio rico em etanol, tem mostrado uma certa capacidade de interferência do álcool em modular a atividade das proteínas da membrana, como Pma1, que é a H-ATPase primária responsável por manter o pH intracelular e o potencial da membrana plasmática na *Saccharomyces cerevisiae* (AGUILERA *et al*., 2006). Demonstra-se assim que a membrana da célula de levedura é o alvo principal do efeito tóxico do etanol (ALEXANDRE *et al*.,1994; BLOCK e BISSON, 2002;).

São diversas as cepas de leveduras disponíveis para a fermentação do hidromel, contudo, comercialmente falando, as mais viáveis são as mesmas utilizadas nas indústrias cervejeira e vinífera (SCHULLER e CASAL,2005). Essa

predileção, acaba dando uma certa atenção as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*, pois apresentam bons resultados fermentativos, boa resistência ao álcool e a capacidade de processar ácidos málicos, alta velocidade de fermentação, elevado poder floculante, além de produzir compostos aromáticos que contribuem para o sabor e aroma do hidromel (BRUNELLI, 2015; GUAN *et al*, 2013).

Porém nem sempre a *Saccharomyces* era vista com bons olhos na produção de hidromel, isso ocorria, pois, devida a baixa homologia entre o mel e a uva, ou seja, por não possuírem estruturas semelhante, os produtores acreditavam que ela não renderia bons produtos para a indústria do hidromel. Mas, estudos foram feitos e a *Saccharomyces* provou-se adequada, por apresentar excelente tolerância às altas concentrações inerentes ao mosto e pela capacidade de crescimento em anaerobiose (CHEN *et al*., 2016; IGLESIAS *et al*. 2014;).

A *Saccharomyces cerevisiae,* tem por características ser uma levedura que pode fermentar com a presença ou ausência de oxigênio. Caso haja presença, ou seja, trabalhe em meio aeróbio, ela converte glicose em água, dióxido de carbono e ATP (trifosfato de adenosina). Já na ausência, ocorre a anaerobiose, onde o açúcar assume papel de nutriente básico para a sobrevivência do microrganismo, gerando assim excrementos interessantes para a indústria alcoólica como o etanol e o dióxido de carbono, vale ressaltar que o álcool possui dupla função no processo fermentativo, além de fornecer o teor alcoólico, atua também como inibidor de microrganismos competidores (GÓES-FAVONI *et al*, 2018; PAIXÃO, 2018).

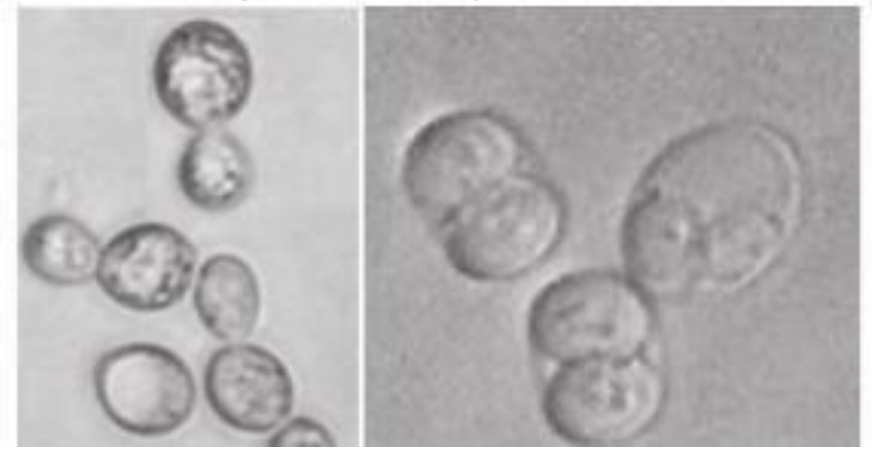
O interesse pela *Saccharomyces cerevisiae* vem desde o começo do século XX, sendo reconhecidamente um sistema paradigma dentre os seres eucariotas unicelulares (SCHNEITER; REINER & MICOLOD, 2005), para Briggs e colaboradores (2004) é sem dúvida a mais estudada das leveduras e um dos microrganismos mais explorados em pesquisas.

Esse extenso estudo e aprofundado debruçar da ciência e indústria sobre a *Saccharomyces cerevisiae* fez com que houvesse hoje em dia uma diversidade genética de estirpes comerciais muito grande (FAY e BENAVIDES, 2005). Tudo isso tem como consequência uma grande valorização nas indústrias da fermentação, uma vez que ela traz características de interesse primordial para a

indústria, como: fermentação rápida e completa de açúcares fermentescíveis; alta produção e tolerância de etanol; *bouquet* característico, mas moderado; possibilidade de uso com mono-, di- e trissacarídeos (DEQUIN, 2001; WALKER e STEWART, 2016). Vale ressaltar que tais características não são exclusividade fenotípicas da *Saccharomyces cerevisiae,* estando presente em muitos outros gêneros de leveduras, porém é o conjunto e a sinergia dessas qualidades que faz ela receber o título de excelência (STEENSELS e VERSTREPEN, 2014).

A *Saccharomyces cerevisiae* pode apresentar uma morfologia oval ou em forma de elipse, cilindro; na maior parte das vezes é encontrada individualmente ou em pares, podendo ser encontrada em alguns casos em pequenas cadeias (Figura 1), com dimensões médias, apesar de variar de cepa para cepa, de: 2,5-4,5 x 10,5-20 µm (KURTZMAN *et al*., 2010).

Figura 1 - *Saccharomyces cerevisiae.*



Fonte: KURTZMAN; FELL e BOEKHOUT, 2011.

Quanto aos produtos metabólicos secundários decorrentes da fermentação, devido ao elevado número de estirpes desta espécie a generalização é difícil, pois varia muito de acordo com a cepa. (HIRALAL, OLANIRAN e PILLAY, 2014; PEDDIE, 1990;).

Comumente estudada como microrganismo deteriorante em cervejas, a *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* é provavelmente o principal deteriorante das *Saccharomyces* (SUIKER & WÖSTEN, 2022). Por exemplo, cerca de dois terços das contaminações relacionadas a *Saccharomyces cerevisea* em cerveja artesanal na Patagônia Andina estão relacionados a *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (LATORRE *et al*., 2020). A deterioração da cerveja por esta levedura se manifesta por fermentação de

carboidratos residuais, incluindo dextrinas e amido, produzindo *off-flavors* fenólicos e pela formação de névoa e superatenuação, o que acarreta a elevação do teor alcoólico, carbonatação excessiva e corpo enfraquecido ao paladar (HUTZLER *et al*. 2012; PRIEST & CAMPBELL, 1996; SUIKER & WÖSTEN, 2022).

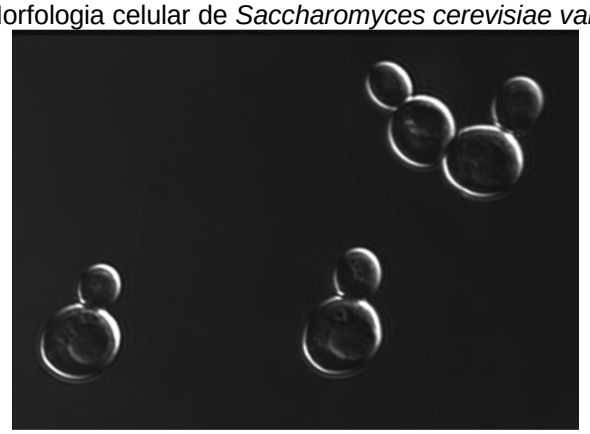
A *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, tem a capacidade de fermentar amido e dextrina, devido à enzima extracelular, glucoamilase, que hidrolisa o amido/dextrina em glicose (ERRAT & STEWART, 1981).

Porém, apesar de ser muitas vezes considerado como um microrganismo indesejável, a *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* vem sendo comercializada como alternativa à *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua capacidade de atenuação e aporte sensorial na bebida, uma vez que pode levar a alterações no sabor, mas não dá sabor desagradável à cerveja (ANDREWS & GILLILAND, 1952). Com um melhor conhecimento do fenótipo e propriedades cervejeiras fisiológicas, cepas de levedura com capacidade de superatenuação poderiam ser ainda mais usadas para produzir cervejas com menores teores de álcool, carboidratos e calorias (MEIER- DÖRNBERG *et al*., 2018).

As cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* apresentam uma forma esférica (Figura 2), morfologia alongada e esférica. A forma da célula geralmente está intimamente ligada a padrões de brotamento, células apresentam uma forma oval geralmente.

As células variam em tamanho de 3,99 µm de diâmetro a 4,5 µm, apresentando tamanho celular menor que as demais cepas utilizadas na fermentação de cervejas *ale* e *lager* (POWELL & KERRUISH, 2017). Além disso as células demonstram um comportamento de não aglomeração, aparecendo isoladamente ou em pares de uma a quatro células (MEIER-DÖRNBERG *et al*., 2018).

Figura 2 – Morfologia celular de *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus.*



Fonte: Meier-Dörnberg *et al*., 2018.

A *Saccharomyces pastorianus* é uma levedura comumente utilizada na indústria cervejeira, na produção de cervejas *lager*. Enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie pura, a *Saccharomyces pastorianus* é um híbrido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus* (HUTZLER *et al*., 2023).

A proposta atualmente aceita sobre o surgimento da *Saccharomyces pastorianus* é de uma hibridização acidental, na qual a *Saccharomyces eubayanus*, foi introduzida acidentalmente em um habitat existente de *Saccharomyces cerevisiae*, os dois microrganismos interagiram e formaram uma nova espécie, a *Saccharomyces pastorianus* (GALLONE *et al*. 2017, SAMPAIO *et al*. 2017). Libkind *et al*. (2011) relatou que, mesmo o evento de hibridização tendo ocorrido no fim do séc. XVI, apenas em 2011 é que surgem os primeiros relatos de isolamento da *S. eubayanus*, que ocorreu na América do Sul e a levedura foi posteriormente encontrada na Argentina, Chile, Tibete, China, Nova Zelândia, EUA e, mais recentemente, na Irlanda (BERGIN *et al*., 2022; EIZAGUIRRE *et al*., 2018; GAYEVSKIY & GODDARD, 2016; LIBKIND *et al*., 2011; NESPOLO *et al*., 2020; PERIS *et al*., 2014).

Nos dias atuais é aceito que existem duas linhagens modernas de *Saccharomyces pastorianus,* geralmente designadas como Grupo I (*Saaz*) e Grupo II (*Frohberg*) (HUTZLER *et al*., 2023). A identificação desses dois grupos remonta ao tempo dos primeiros isolamentos de Hansen e Linder, quando Hansen notou que um de seus isolados mais utilizados, o *Unterhefe Nr. 1* (alta fermentação) tinha a formação, dos seus esporos, iniciada apenas 5 a 6 dias

após a inoculação, enquanto o *Unterhefe Nr. 2* (baixa fermentação) esporulou rapidamente (HANSEN apud HUTZLER *et al*., 2023).

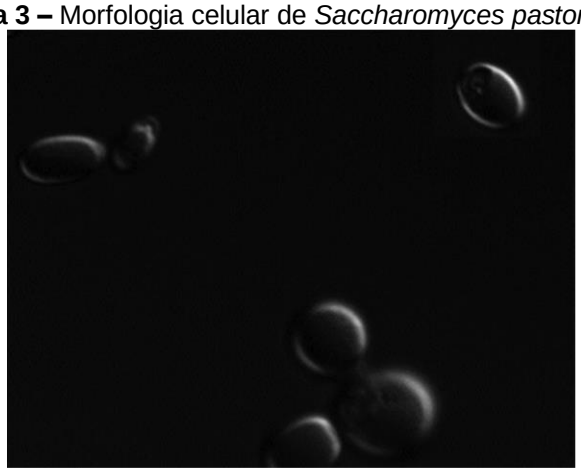
Unterhefe Nr. 1 é a levedura Spaten-Carlsberg original e foi chamada *Saccharomyces carlsbergensis*, sendo mais tarde reconhecida como *Saccharomyces pastorianus,* mas o sinônimo *Saccharomyces carlsbergensis* foi amplamente utilizado na literatura. O segundo isolado, *Unterhefe Nr.2*, foi classificado como *Saccharomyces monacensis*, mas é, na verdade, uma variante do *Saccharomyces pastorianus* (HUTZLER *et al*., 2023).

Em Berlim, Lindner também isolou leveduras com diferentes propriedades de fermentação. O primeiro grupo, chamado *Saaz,* originou-se da *Common Brewhouse* (*Bürgerliches Brauhaus*) em Saaz na Boêmia. O outro isolado, *Frohberg*, havia sido isolado de uma amostra enviada ao instituto de Berlim pelo proprietário da cervejaria *Frohberg* em Grimma (REINKE apud HUTZLER *et al*., 2023). No Instituto de Berlim, as cepas do tipo *Saaz* foram classificadas como 'S' (*schwer*, referente a fermentação lenta) e tipo *Frohberg* como ‘F’ (*flott*, referente à fermentação rápida) (REINKE apud HUTZLER *et al*., 2023). Hoje em dia a terminologia comum para essas leveduras é Grupo I (S; *Saaz*) e Grupo II (F; *Frohberg*), estando as cepas *Unterhefe Nr. 1 e Unterhefe Nr. 2* inseridas no Grupo I (HUTZLER *et al*. 2023).

A cepa mais conhecida do grupo Frohberg é *Saccharomyces pastorianus* TUM 34/70, que foi sequenciado em 2009 (NAKAO *et al.,* 2009). Sendo considerada uma cepa de floculação rápida e intensa; com capacidade de metabolizar glucose, *frutose*, sucrose, maltose e maltotriose; não produzindo *off-flavors* fenólicos; e capaz de atribuir um perfil aromático balanceado com tendência a notas florais e frutais em cervejas *lagers* (MEIER-DÖRNBERG *et al*., 2017).

Como pode ser visto na Figura 3, a cepa de levedura de baixa fermentação *Saccharomyces pastorianus* – TUM 34/70 R se apresenta em forma de células ovais, com tamanhos de 6,01 µm a 6,5 µm de diâmetro (MEIER-DÖRNBERG *et al*., 2018). Dentro de sua população, as leveduras normalmente mostram muita homogeneidade morfológica (POWELL & KERRUISH 2017).

Figura 3 – Morfologia celular de *Saccharomyces pastorianus.*



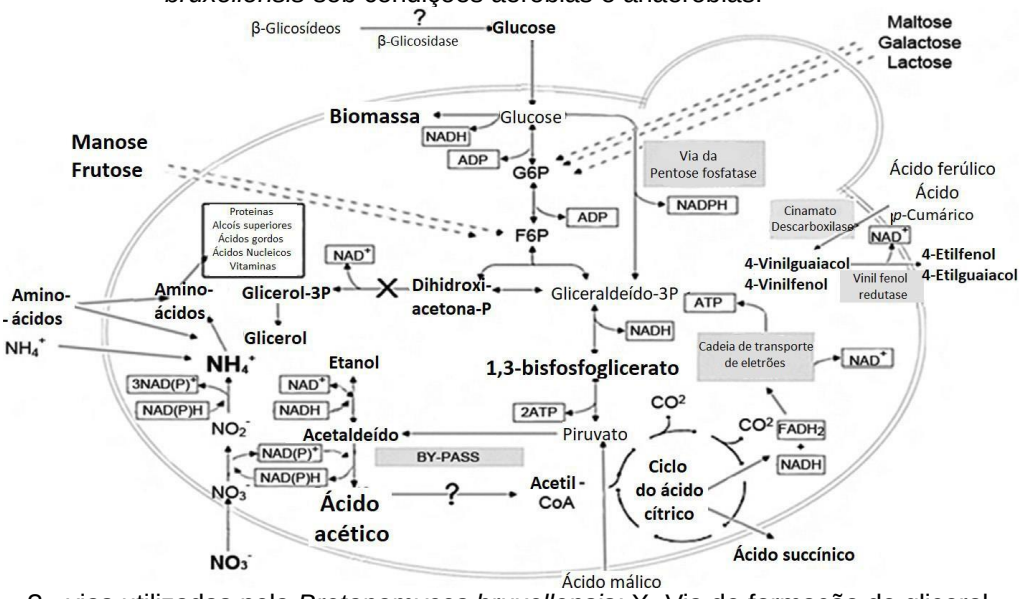
Fonte: Meier-Dörnberg *et al*., 2018.

Pertencente à família *Pichiaceae* é uma das leveduras que não esporulam (ALMEIDA, 2017).

As leveduras do gênero *Brettanomyces* possuem um comportamento fermentativo diferente das demais leveduras, seu maior ponto de divergência é o efeito *Cluster*, ato de inibir a fermentação alcoólica em meio anaeróbio, essa divergência acontece, pois, a maioria das estirpes agem de maneira inversa (ALMEIDA, 2017; WHITE e ZAINASHEFF, 2010).

De crescimento lento e produtora de aromas característicos, é uma levedura utilizada quando se deseja maior concentração de açúcar residual e acúmulo de produtos secundários, principalmente os fenólicos como o 4-etilguaiacol e o 4-etilfenol (BAI FLAGFELDT *et al*., 2009; GILLILAND, 1961). A produção desses compostos é dada por meio de vias metabólicas inerentes da levedura (Figura 4), onde são representadas as vias metabólicas da *Bretanomyces bruxellensis* (SMITH e DIVOL, 2016). Esse *bouquet* aromático é normalmente chamado de “aroma a *Brett*”, sendo caracterizado pela presença de aromas que remetem a: cravo, especiarias, estrebaria, fumo, fenólico, maçã, floral, fruta tropical, cítrico, picante entre outros (STEENSELS *et al*., 2015).

Figura 4 - Representação das vias de utilização de carbono e azoto em *Bretanomyces bruxellensis* sob condições aeróbias e anaeróbias.



? - vias utilizadas pela *Bretanomyces bruxellensis;* X- Via de formação de glicerol.
Fonte: SMITH e DIVOL, 2016 *apud* ALMEIDA, 2017.

Na Figura 4 é possível encontrar ponto de interrogação (?) e “X”. O primeiro símbolo é utilizado para descrever as vias utilizadas pela *Bretanomyces bruxellensis*. Enquanto o “X”, presente na via de formação de glicerol, indica que apenas certas espécies possuem uma expressão de gene suficientemente alta para formar glicerol (ALMEIDA, 2017).

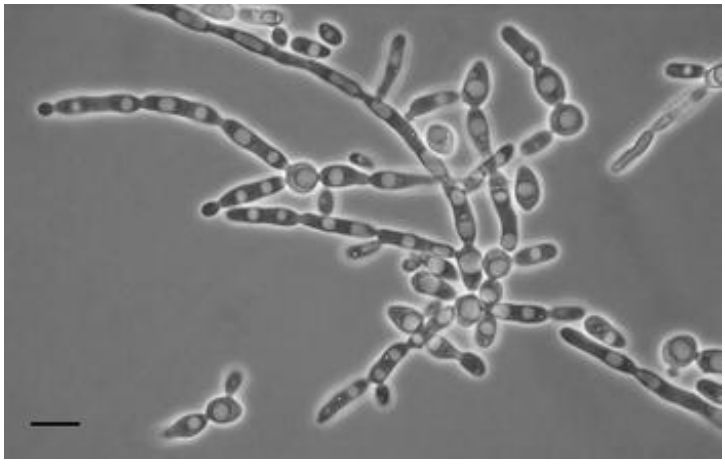
Quando se estudam as necessidades nutricionais da *Bretanomyces. spp.* encontram-se parâmetros muito similares aos da *Saccharomyces cerevisiae,* porém sua tolerância alcoólica não chega a ser maior que 13%. O crescimento é lento, esse fator é agravado com pH menor que 3,4 e temperaturas baixa, tendo como faixa ideal de temperatura o intervalo entre 13°C e 32°C (ALMEIDA, 2017). Normalmente a *Brettanomyces* é utilizada de três maneiras distintas: fermentação pura, sem colaboração de outra levedura; fermentação sequenciada, na qual outras leveduras são inseridas ao longo da fermentação; ou então em fermentação mista, processo no qual duas ou mais leveduras são inoculadas ao mesmo tempo (ALMEIDA, 2017; YAKOBSON, 2010).

Pesquisas relacionadas a vinhos e cervejas identificaram 5 espécies de *Brettanomyces: Bretanomyces bruxellensis,* também chamada de *Bretanomyces intermedius, Bretanomyces lambicus* e *Bretanomyces custersii*; *Bretanomyces custersianus* ou *Bretanomyces claussenii*; *Bretanomyces anomalus*; *Bretanomyces naardensis* e *Bretanomyces nanus*. Sendo que dessas, apenas

as três primeiras, em especial a *Bretanomyces bruxellensis*, são usadas pela indústria cervejeira e vinífera (ALMEIDA, 2017; WHITE e ZAINASHEFF, 2010). A *Bretanomyces bruxellensis* é muito utilizada em fermentações secundárias, *Bretanomyces lambicus* é mais implementada em cervejas do estilo *Lambic*, *Flandres red* e cervejas escuras, já a *Bretanomyces anomalus* não é muito explorada em estudos, sendo considera muitas vezes uma cepa de *Bretanomyces bruxellensis* (WHITE e ZAINASHEFF, 2010; YAKOBSON, 2010).

Apresenta células pequenas, ovais e redondas de extremidade pontiaguda (Figura 5). Em meios adequados a maioria das estirpes tem tendência a formar pseudomicélios (GILLILAND, 1961).

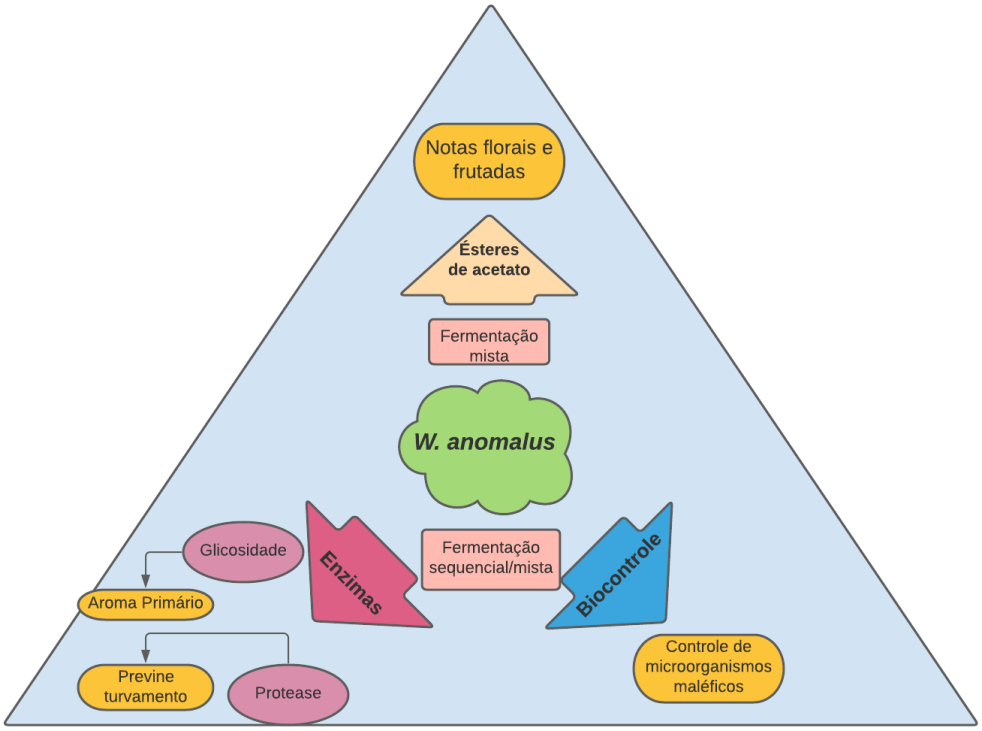
Figura 5 –*Brettanomyces.*



Fonte: Péter *et al.*, 2017.

Anteriormente conhecida como *Pichia anomala*, *Hansenula anomala* ou *Candida pelliculosa* foi incluída no gênero *Wickerhamomyces* com base na análise filogenética de sequências gênicas, o que tem causado grandes mudanças na classificação das leveduras (KURTZMAN, 2011). Esta espécie é frequentemente isolada de uvas e vinhos, estando associada à produção excessiva de acetato de etila, o que representa uma séria desvantagem para seu uso na vinificação, esta espécie ganhou considerável importância para a indústria do vinho uma vez que apresenta características fisiológicas e metabólicas interessantes e potencialmente exploráveis (Figura 6).

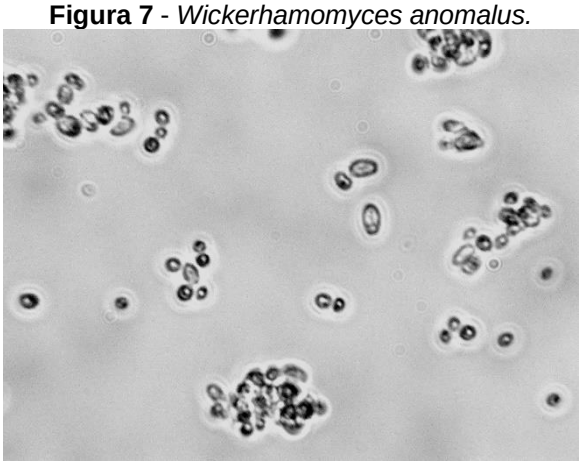
Figura 6 - Benefícios da *Wickerhamomyces anomalus* na produção de vinho.



Fonte: Padilla *et al*., 2018 (adaptado).

Wickerhamomyces anomalus (WA) é uma levedura heterotálica ascomiceta, formando de um a quatro ascósporos em forma de chapéu (KURTZMAN, 1998; PASSOTH *et al*.,2006). Tem sua reprodução por brotamento e se apresenta em formato que varia de esferoidal a alongado, medindo entre 1,9 e 4,1 µm x 2,1 a 6,1 µm isoladamente, podem surgir em pares ou pequenos aglomerados (Figura 7) (PASSOTH *et al*., 2006).

Figura 7 - *Wickerhamomyces anomalus.*



Fonte: PASSOTH *et al*., 2006.

Wickerhamomyces anomalus é um nome amplamente utilizado e uma proposta para conservar o nome da espécie *anomala* (-us). É uma espécie de

levedura biotecnologicamente relevante com aplicações alimentares, ambientais, industriais e médicas, podendo ser encontradas nos mais diversos habitats naturais, que vão de exsudatos de árvores, plantas e cascas de frutas, insetos, tecidos humanos e fezes, a águas residuais e ambientes marinhos. A versatilidade desta espécie é incentivada por sua capacidade de tolerar condições ambientais extremas como estresse oxidativo, salino e osmótico, bem como choques de pH e temperatura (WALKER, 2011). Devido a essas características, essa levedura pode ser um organismo deteriorante, por exemplo, em produtos alimentícios com alto teor de açúcar (LANCIOTTI *et al*, 1998; TOKUOKA *et al*., 1985) ou silagem (JONSSON e PAHLOW, 1984).

Wickerhamomyces anomalus é uma levedura onipresente na produção de vinho, que foi anteriormente associada a instalações da vinícola, uva, mosto e ao vinho. Diferentes estudos descreveram que *Wickerhamomyces anomalus,* isolada do mosto de uva, foi capaz de persistir até o final da fermentação em diferentes fontes de carbono (RENOUF; CLAISSE e LONVAUD-FUNEL, 2007; WANG *et al*., 2020). Algumas cepas podem tolerar até 12,5% (v / v) de etanol e são conhecidas por produzir toxinas responsáveis por fazer um controle biológico de outros microrganismos maléficos ao vinho (SABEL *et al*., 2014; WALKER, 2011), permitindo que esta espécie compita com outras leveduras no mesmo ambiente. Graças ao seu metabolismo totalmente aeróbio ou fracamente fermentativo, é capaz de crescer abundantemente em bebidas fermentadas e é conhecido pela formação de filme na superfície de vinhos com níveis insuficientes de sulfito para prevenir seu crescimento (DU TOIT e PRETORIUS, 2000).

Cepas de *Wickerhamomyces anomalus* têm sido relatadas como uma fonte interessante de diferentes enzimas que podem ser usadas na indústria de bebidas (MADRIGAL, MAICAS e MATEO, 2013). O aroma é uma das características mais apreciáveis que influenciam a qualidade geral dos fermentados alcoólicos. Leveduras *não-Saccharomyces* podem ter um impacto no aroma primário e secundário pela produção de enzimas e metabólitos, respectivamente. Cepas identificadas como *Wickerhamomyces anomalus* ou seus nomes anteriores foram relatadas por produzirem glicosidases, como β-d-glicosidase, α-l-arabinofuranosidase, α-l-ramnosidase e β-d-xilosidase, que

estão envolvidas na liberação de compostos de aroma (PADILLA e MANZANARES, 2016).

O potencial enzimático de cepas não-*Saccharomyces* com o objetivo de identificar boas cepas é visto em estudos como o de Rosi, Vinella e Domizio (1994), no qual 20 espécies de leveduras diferentes apresentaram atividade β-glicosidase. Os resultados de outras triagens concluíram que cepas de WA exibiram maior atividade β-glicosidase quando comparadas com espécies de leveduras pertencentes a outros gêneros, como *Candida*, *Dekkera* ou *Torulaspora* (CHAROENCHAI *et al*., 1997; MANZANARES *et al*, 2000).

Além de apresentar atividade de β-d-glicosidase, outras cepas de *Wickerhamomyces anomalus* exibiram atividade de α-l-arabinofuranosidase e β-d-xilosidase em *screenings* com 300 cepas diferentes (LÓPEZ; MATEO e MAICAS, 2015; SPAGNA *et al*. 2002). Da mesma forma percebeu-se produção de β-d-xilosidase com parâmetros de pH, temperatura e concentrações de glicose e etanol normalmente encontradas durante a fermentação de vinho (MANZANARES, RAMÓN e QUEROL, 1999).

Apesar desse potencial, o efeito das enzimas purificadas na liberação de compostos voláteis de fermentados tem sido pouco explorado. Em testes com suco de uva do tipo *Muscat* e vinho tratado com β-d-glicosidase, proveniente de *Wickerhamomyces anomalus,* foi observada a produção de terpeno (SWANGKEAW *et al*., 2009; 2011). Essa glicosidase foi eficiente em liberar aromas desejáveis principalmente durante a fase final da fermentação alcoólica devido a sua tolerância a altas concentrações de etanol (LÓPEZ; MATEO e MAICAS, 2015). No entanto, a eficácia da *Wickerhamomyces anomalus* na produção de α-l-arabinofuranosidase, α-l-ramnosidase e β-d-xilosidase para a liberação de compostos aromáticos durante a vinificação ainda não foi explorada.

Para além da contribuição para o perfil aromático dos vinhos, outras enzimas relevantes para a fermentação são também produzidas por estirpes de *Wickerhamomyces anomalus*. A degradação por enzimas das proteínas responsáveis pela turbidez é uma alternativa atraente para a clarificação, em especial por bentonita, porque minimiza as perdas de volume e aroma do vinho (VAN RESBURG e PRETORIUS, 2000). Na verdade, as leveduras que secretam enzimas proteolíticas são de alto interesse biotecnológico para a prevenção da

turbidez de proteínas porque podem ser adicionadas diretamente como culturas iniciais. É o caso da WA 227, que secreta a protease aspártica WaAPR1, no intuito de reduzir o teor de proteína do mosto de uva (SCHANDLER *et al*., 2016).

A *Lachancea thermotolerans* (LT) é uma espécie *não-Saccharomyces* ainda não bem explorada com enorme potencial biotecnológico (HRANILOVIC *et al*., 2017), anteriormente conhecido como *Kluyveromyces thermotolerans* (KURTZMAN, 2003). O gênero *Lachancea* foi proposto por Kurtzman em 2003 para acomodar um grupo de vários gêneros diferentes mostrando semelhanças do rRNA. De acordo com Lachance e Kurtzman (2011), o gênero continua a ancorar outras 11 espécies até hoje: *L. cidri, L. dasiensis, L. fantastica, L. fermentati, L. kluyveri, L. lanzarotensis, L. meyersi, L. mirantina, L. nothofagi, L. quebecensis* e *L. Walti* (SOUCIET *et al*., 2009).

Uma das peculiaridades de *Lanchacea thermotolerans* é sua capacidade de produzir ácido L-láctico durante a fermentação alcoólica (JOLLY, VARELA e PRETORIUS, 2014). Embora a produção de ácido láctico seja incomum entre as leveduras, é de grande interesse biotecnológico no que diz respeito aos processos de fermentação onde a fermentação alcoólica com a acidificação concomitante é um benefício, como a vinificação (DEQUIN, 2001).

Nos últimos anos vem sendo estudada na produção de vinho e cerveja, devido à sua capacidade de diminuir o pH por meio da produção de ácido lático (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021). Frequentemente encontrada em frutas, é muito comum percebê-la no início do processo fermentativo antes da dominação da *Saccharomyces*.

Devido à produção de ácido L-láctico, de 0,23 a 9,6 g/L, dependendo das diferentes condições de ensaio (BENITO *et al*.,2015; GOBBI *et al*., 2013), vinhos produzidos por fermentação com *Lanchacea thermotolerans* são reconhecidos por trazerem diferentes propriedades sensoriais, principalmente em termos de sensação na boca, com um sabor ácido aumentado (BENITO *et al*., 2015,2016; GOBBI *et al*., 2013). Essas características despertaram o interesse de enólogos que começaram a desejá-las, de tal forma que LT está sendo comercializada como leveduras secas desde 2012 (CONCERTO ™ e MELODY ™) e é recomendada para aumentar a complexidade e intensidade do sabor, melhorar a acidez total e reduzir a acidez volátil (MORATA *et al*, 2018; PETRUZZI *et al*., 2017).

Estudos demonstraram que a *Lanchacea thermotolerans* é capaz de produzir vinhos com maiores notas "picantes" e ácidas, melhorando assim a qualidade geral do vinho (BALIKCI *et al*., 2016; GOBBI *et al*., 2013). Também é descrito como produtor de isobutirato de etila, que traz nuances de morango, e por incrementar as notas frutadas, provavelmente favorecidas pelo aumento na acidez (OGAWA *et al*.,2022).

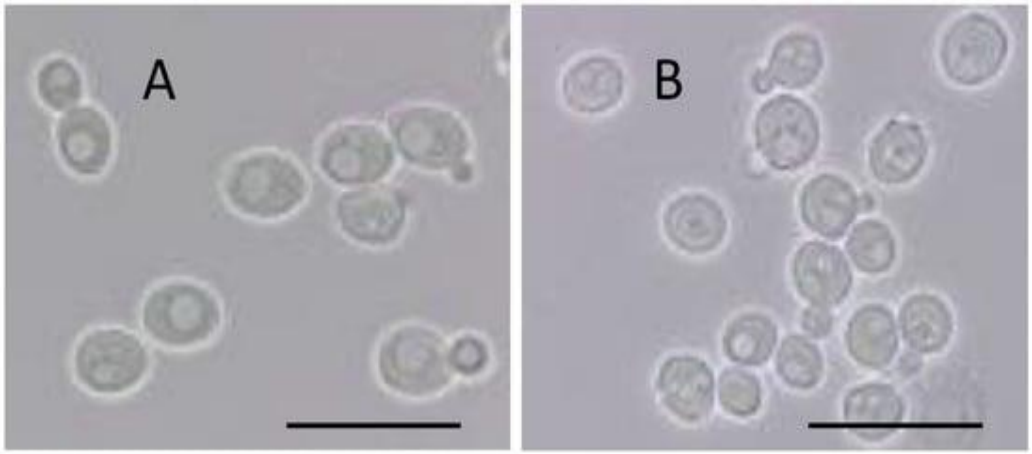
Um exemplo dessa melhoria organoléptica foi o estudo realizado com o vinho espanhol *Airén* (BENITO *et al*., 2016), no qual a cepa LT617 foi selecionada para realização de fermentação combinada, com o intuito de aumentar a acidez e a qualidade do vinho. Embora esta variedade de uva espanhola seja considerada muito neutra e produtiva, os vinhos em que é utilizada são geralmente considerados de baixa qualidade devido ao seu alto teor de açúcar e falta de acidez (BENITO *et al*., 2016).

Durante a fermentação do vinho, *Lanchacea thermotolerans* também causa um aumento nos teores de lactato de etila (RIBÉREAU-GAYON *et al*, 2021). Devido a essas características metabólicas, produção de ácido láctico e lactato de etila, esta levedura está sendo atualmente estudada para fins de produção de cerveja sem a necessidade de inoculação de *Lactobacillus* (DOMIZIO *et al*., 2016). Assim, usar LT para produzir cerveja com um sabor mais ácido pode ser mais simples do que tentar manter uma co-fermentação entre leveduras e bactérias.

No entanto, a via metabólica de conversão de açúcares em ácido lático por *Lanchacea thermotolerans* ainda não é completamente entendida. Descobertas mostraram que níveis de ácido láctico entre 1 e 9 g/L foram encontrados em vinhos fermentados com LT (GOBBI *et al*, 2013). O metabolismo de açúcares em ácido láctico também é uma forma de reduzir o teor de álcool nos vinhos, e uma redução de até 0,5 a 1% (v / v) de álcool é possível (GOBBI *et al*, 2013).

Morfologicamente se apresenta na forma de glóbulos ou elipses, sendo indistinguível da *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 8), e pode ser encontrada como células isoladas em meio líquido ou em pequenos grupos (COMBINA *et al*., 2005; GANTER, 2006; HRANILOVIC *et al*., 2017; KURTZMAN, 2003).

Figura 8 – (A) *Saccharomyces cerevisiae* (B) *Lachancea thermotolerans*.



Fonte: MORATA *et al*, 2018.

A *Lanchacea thermotolerans* é capaz de fermentar glicose, sacarose e fracamente galactose (SCHNIERDA *et al*, 2014). Apresenta capacidade variável para fermentar maltose, trealose e rafinose (LACHANCE e KURTZMAN, 2011). A nutrição com nitrogênio é semelhante à *Saccharomyces cerevisiae*, sendo necessário um mínimo de 200 mg/L de YAN (nitrogênio assimilável por levedura) para evitar fermentações lentas ou paradas (CIANI *et al*., 2006). As cepas de LT podem expressar as seguintes atividades enzimáticas extracelulares com efeito no aroma do vinho ou extração de fenol: Esterase, Esterase-Lipase, ß-glicosidase, Pectinase, Celulase, Xilanase, Glucanase (ESCRIBANO *et al*, 2017).

Apresenta um poder fermentativo moderado e uma tolerância ao etanol em torno de 5–9 % v/v (APONTE e BLAIOTTA, 2016; COMITINI *et al*., 2011; FLEET, 2003; GOBBI *et al*,2013; KAPSOPOULOU *et al*., 2007). É possível que a fermentação sofra uma redução o grau alcoólico na escala de 0,7 % v/v (CIANI, BECO e COMITINI, 2016). Observou-se que ela é capaz de sobreviver vários dias na presença de 9 % v/v de etanol (KAPSOPOULOU *et al*., 2007), e que tem uma boa persistência mesmo quando a fermentação é dominada por *Saccharomyces cerevisiae* (MILLS; JOHANNSEN e COCOLIN, 2002). Essas propriedades metabólicas fazem com que apareça durante a fase intermediária do processo fermentativo, antes da prevalência total de cepas altamente fermentativas de *Saccharomyces cerevisiae*. O uso de LT em fermentações sequenciais ou mistas tem tendência a produzir fermentações lentas com mais dificuldades para fermentar a frutose (CIANI *et al*., 2006). Além disso, a

necessidade de disponibilidade de oxigênio para a persistência de LT parece ser maior do que para *Saccharomyces cerevisiae* (HOLM HANSEN *et al*., 2001). A tolerância à temperatura é semelhante à média das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando um bom crescimento a 25-30° C, mas crescimento mais lento abaixo de 20° C (SCHNIERDA *et al*., 2014).

Algumas cepas de LT têm sido usadas como agentes de biocontrole fúngico em uvas e vinhas para inibir o crescimento de *Aspergillus* (FIORI *et al*, 2014). Essas cepas não afetam as propriedades metabólicas e o desempenho de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica (NALLY *et al*, 2018).

4.3 HIDROMEL

A legislação brasileira vigente, por meio da Instrução Normativa n° 64 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, determina a faixa de teor alcoólico possível para o hidromel, que vai de 4 a 14 % a 20° C (BRASIL, 2008). Enquanto a Instrução Normativa 34 do mesmo órgão, fica responsável por determinar os parâmetros físico-químicos (Tabela 2). Já o Decreto nº 6.871, responsável por regulamentar a padronização, registro e classificação de bebidas em território nacional, versa que além das questões acerca de teor alcoólico, para que uma bebida seja considerada hidromel, ela deve ser produto da fermentação alcoólica de uma solução de mel em água potável acrescida de sais e nutrientes (BRASIL, 2009).

Quando se trata especificamente de hidromel, a legislação brasileira é extremamente falha e vaga, apresentando apenas uma maneira de classificação da bebida, de acordo com o teor de açúcar em suave ou seco. Em contrapartida, é possível verificar que existem inúmeras maneiras de caracterização “paralela” de um hidromel, que pode ser pelo seu dulçor, resultado da quantidade de açúcar residual: seco, meio, doce; pela sua carbonatação: normal (tranquilo), levemente carbonatado e espumante; e de acordo com o teor alcoólico: suave ou forte. Todas essas classificações vão sofrer influência de acordo com as técnicas de produção e insumos utilizados, são variáveis a serem consideradas: tempo de fermentação, quantidade e qualidade do mel utilizado na diluição, escolha da levedura, concentração de açúcares e da graduação alcoólica. Ainda há a

possibilidade de adição de frutas, vegetais, ervas e/ou especiarias, a fim de aumentar a complexidade organoléptica do produto ofertado. (DE SOUSA *et al*., 2018; MORAES, 2014; PEREIRA *et al*., 2017). O que acaba dando origem a diversas variações da bebida (Tabela 3).

Tabela 2 - Requisitos físico-químicos do hidromel de acordo com a Instrução Normativa nº34.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Classificação
Acidez fixa (mEq/L)	30	Não se aplica	Não se aplica
Acidez total (mEq/L)	50	130	Não se aplica
Acidez volátil (mEq/L)	Não se aplica	20	Não se aplica
Anidro sulfuroso (g/L)	Não se aplica	0,35	Não se aplica
Cinzas (g/L)	1,5	Não se aplica	Não se aplica
Cloretos totais (g/L)	Não se aplica	0,5	Não se aplica
Extrato seco reduzido (g/L)	7	Não se aplica	Não se aplica
Graduação alcoólica (% v/v à 20ºC)	4	14	Não se aplica
Teor de açúcar (g/L)	Não se aplica	≤ 3	Seco
	> 3	Não se aplica	Suave

Fonte: Brasil (2012) - adaptado.

Tabela 3 - Tipos de hidroméis com base nos insumos adicionados ao mosto e envelhecimento

DENOMINAÇÃO	INGREDIENTES
Mead	Hidromel clássico – mel e água
Great Mead	Hidromel envelhecido
Melomel	Adição de frutas ao mosto, excetuando-se maçãs e uvas
Pyment	Adição de uvas ao mosto (preferencialmente *vitis* viníferas)
Cyser	Adição de maçãs ao mosto
Methelgin	Adição de especiarias ao mosto, desde lúpulo a pétalas de rosas
Braggot	Adição de malte ao mosto
Hippocras	Adição de pimentas ao mosto

Fonte: Berry, 2007 *apud* Brunelli, 2015.

Ainda incipiente no mercado brasileiro, o hidromel não possui dados específicos quanto ao seu consumo no Brasil, normalmente sendo atrelado ao consumo de outras bebidas, categorizadas como “outras bebidas fermentadas” (SEBRAE, 2015).

Considerada uma das bebidas mais antigas do mundo, teve seu consumo em épocas mais antigas de forma generalizada, chegando a dar origem ao nome da festa e período de comemoração das núpcias, "lua de mel" (JÚNIOR, CANAVER e BASSAN, 2015), estando associada a um ritual, no qual os recém-casados eram presenteados com grandes quantias de hidromel que deveriam ser consumidas no período compreendido entre da semana subsequente ao casamento e ao mês seguinte. Sendo assim associado à fertilidade, virilidade, força que faziam um bom casamento. Porém com o passar das épocas, foi perdendo espaço e vindo a ser substituído por outras bebidas (SILVA, 2017).

4.4 FERMENTAÇÃO

A sociedade conhece há alguns milênios como converter misturas não alcoólicas em alcoólicas por meio do processo fermentativo, de maneira empírica e espontânea os egípcios faziam isso há pelo menos 4 mil anos. Porém, foi só no século XIX, com Pasteur, que a fermentação foi mais bem estudada e ficou clara a importância das leveduras nesse processo em um experimento anaeróbio realizado pelo cientista (FERREIRA *et al*., 2012; LIMA *et al*., 2019).

4.4.1 Bioquímica

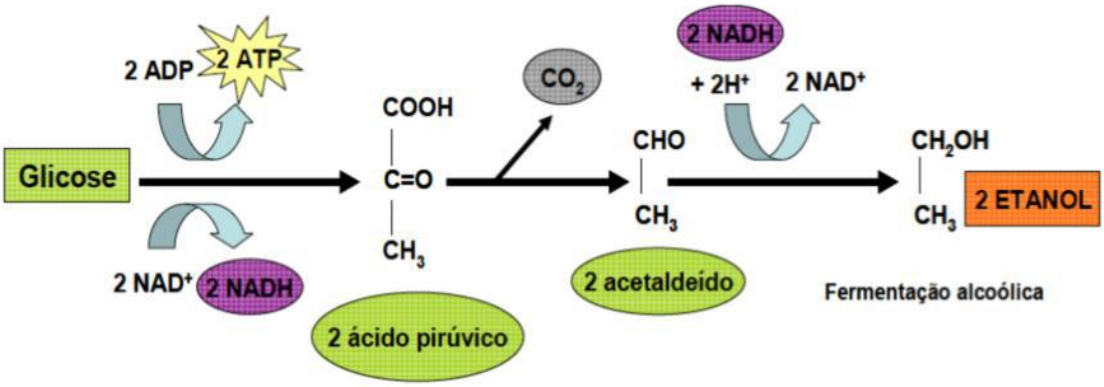
Leveduras que apresentam a característica de serem aeróbias facultativas, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de agir em aerobiose ou anaerobiose. Na aerobiose, ou seja, com presença de oxigênio, o microrganismo acaba convertendo a glicose em ATP, gás carbônico e água; contudo em meio anaeróbio esse mesmo açúcar é utilizado para que a levedura consiga sobreviver e multiplicar, gerando assim excrementos úteis para a indústria de bebidas: o gás carbônico e o etanol (DE GÓES-FAVONI *et al*, 2018; PAIXÃO, 2018).

Para que o etanol seja obtido por meio da transformação dos açúcares presentes na preparação, algumas reações devem ocorrer de maneira

sequencial, tais reações são catalisadas por enzimas presentes no citoplasma celular, local onde ocorre a fermentação. (BORZANI, LIMA e AQUARONE, 2001; MADIGAN *et al*., 2010). Quando se fala de fermentação alcoólica, deve ter-se em mente que a principal rota metabólica existente é a glicólise, na qual a glicose é metabolizada e piruvato, na proporção de 1:2, em condições anaeróbias o piruvato é transformado em etanol, havendo também desprendimento de CO_2 (BAI, ANSERSON, MOO-YOUNG, 2008 *apud* PACHECO, 2010).

A fermentação é dividida em duas fases, a primeira é a glicólise, já a segunda é a fermentação propriamente dita. A quebra da glicose, ou seja, conversão de monossacarídeos em piruvato, só é possível graças a dez reações enzimáticas em sequência e os ATPs produzidos nesse primeiro momento, são utilizados pela levedura na sua biossíntese (Figura 9) (MADIGAN *et al*, 2010). Já o segundo momento, ocorre, pois, a levedura está impedida de completar o processo por meio do ciclo de Krebs, isso pois o meio anaeróbio bloqueia tal via, de tal maneira que o piruvato originado na primeira fase sofre descarboxilação, gerando assim gás carbônico e acetaldeído, que por meio da ação da desidrogenase, é transformado em etanol (BORZANI, LIMA e AQUARONE, 2001; MADIGAN *et al*., 2010; PACHECO, 2010).

Figura 9 - Transformação de glicose em etanol.



Fonte: GALASSI, 2007 *apud* COUTINHO, 2020.

Apesar de ter sido um processo fortemente estudado por Louis Pasteur na segunda metade do século XIX, foi outro conterrâneo seu, Gay-Lussac, que conseguiu, no começo do mesmo século, descrever como agia o mecanismo das leveduras; também é dele a Lei Volumétrica, que acabou dando origem a unidade de volume para álcoois o "°GL". Gay-Lussac, foi também responsável pela equação de rendimento, equação que que afirma que 100g de glicose

originará 51,1 g de etanol e 48,9 g de CO_2, gerando assim um rendimento, pelo menos teoricamente, de 51,1 %. Esse valor recebe o nome de coeficiente de Gay-Lussac e é dado básico para calcular a eficiência de conversão (JACKMAN, BU´LOCK e KRISTIANSEN, 2009; MILESKI, 2016).

4.4.2 Compostos secundários obtidos pela fermentação

A composição de aromas e sabores de bebidas fermentadas é uma intrincada conexão de substâncias oriundas da matéria prima para fazer o mosto. Mas é a etapa de fermentação que traz o maior peso de aporte organoléptico, isso se dá pela incontável quantidade de metabólitos, produzidos pelas leveduras, e suas reações (BOULTON & QUAIN, 2001; DA SILVA, 2021).

A concentração desses componentes vai variar de estirpe para estirpe (PROCOPIO; QIAN e BECKER,2011), isso demanda uma certa atenção para que alguns compostos sejam acondicionados em certos parâmetros para que não haja interferência que desequilibre o *bouquet* (PIRES *et al*.,2014).

Dentre os subprodutos formados pelas leveduras podemos citar etanal, álcoois superiores, ésteres e compostos fenólicos (BOULTON e QUAIN, 2001).

O etanal, ou acetaldeído, é formado quando o piruvato é descarboxilado e grande porção desse composto é posteriormente transformado em etanol. Também pode ser produzido por meio da oxidação do etanol por meio de processos químicos ou bioquímicos. A levedura pode liberar pequenas quantidades na bebida alterando seu perfil. O etanal possui aroma característico que dá à bebida uma sensação de oxidada, em alguns casos essa peculiaridade é primordial como no *Jerez* Fino (ZAMORA, 2009).

Os álcoois que possuem mais de dois átomos de carbono são denominados álcoois superiores, sendo responsáveis por desempenharem papel fundamental no perfil aromático de fermentados alcoólicos, contudo se faz necessária uma concentração baixa para que a complexidade aromática se apresente. Produzidos por meio dos metabolismos, tanto de açúcares quanto aminoácidos, são formados quando ceto-ácidos, correspondentes aos esqueletos de carbono de diferentes aminoácidos, sofrem descarboxilação e posterior redução. Fatores como pH e temperatura altos, bem como aeração do

mosto, são responsáveis pelo favorecimento de sua formação (AMERINE e ROESSLER, 1983; RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

A levedura se utiliza da presença de aminoácidos para a produção de alguns álcoois (Tabela 4).

Tabela 4 – Relação entre aminoácidos e álcoois superiores com faixa padrão de concentração.

Aminoácido	Álcool Superior	Concentração (mg/mL)
Valina	2-metil-1-propanol	50 - 150
Leucina	2-metil-1-butanol	30 - 100
Isoleucina	3-metil-1-butanol	80 – 300

Fonte: adaptado de Riberau-Gayon *et al*, 2003.

São precursores de acetatos que têm um grande impacto sobre o aroma. No caso específico de vinhos a sus concentração varia entre 150 e 550 mg/L, porém somente no intervalo de 150 a 300 mg/L é que conseguem aportar a tão desejada complexidade. Já em concentrações superiores acabam fazendo com que outros aromas passem despercebidos (ZAMORA, 2009).

Entre os principais álcoois superiores estão: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (AMERINE e ROESSLER, 1983; RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

Considerados os principais contribuintes do aspecto frutado em bebidas, em especial vinhos, são divididos em dois grupos, que são sintetizados pelas leveduras, os ésteres de acetato e os etílicos de ácidos graxos. Como falado na subseção anterior, os álcoois superiores são precursores dos acetatos, isso ocorre com a condensação desses álcoois acetil-CoA, catalisados na célula por enzimas álcool-acyl-transferase (MASON e DUFOUR, 2000). O equilíbrio entre as enzimas sintetizadoras e hidrolisadoras, álcool-acyl-transferase e esterease, respectivamente, será o responsável pela concentração desse subproduto (FUKUDA *et al*., 1998).

Os ésteres, em geral, apresentam aromas agradáveis frutados e florais, com exceção do acetato de etila, que em altas concentrações apresenta aromas de solvente, verniz e cola, conferindo defeito olfativo. Podem ser formados por duas vias: a esterificação enzimática durante o processo fermentativo e a esterificação química durante o envelhecimento em *sur lie* (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

Durante a fermentação ocorre de ácidos graxos de cadeia curta, C4-C12, oriundo do metabolismo lipídico, sofrerem esterificação dando assim origem a

ésteres etílicos de ácidos graxos (UGLIANO e HENSCHKE, 2009). Mas esses ésteres acabam por sofrer hidrólise no decorrer do armazenamento da bebida, em especial o vinho (MOIO *et. al*., 2004; RAMEY e OUGH, 1980).

Os acetatos são formados durante a fermentação alcoólica e tendem a oxidar rapidamente nos meses subsequentes a fermentação (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021). Já o acetato de etila não se comporta dessa maneira, uma vez que, é geralmente estável durante o envelhecimento. Como os perfis de éster dominados por altas concentrações de acetato de etila, tendo em vista que é o éster com maior produção, podem potencialmente resultar em vinhos com aromas indesejados semelhantes a esmalte, é preciso ter cautela ao escolher variedades de alta produção de ésteres (UGLIANO e HENSCHKE, 2009).

Entre os ésteres de interesse à indústria de bebidas alcoólicas estão o acetato de hexila (aroma maçã verde e floral), acetato de 2-feniletila (rosas, mel, frutado, floral), acetato de isoamila (banana, pera) e acetato de etila (solvente, verniz, cola). Alguns ésteres como o lactato de etila e dietil succinato, não apresentam impacto no aroma em concentrações normais (ZAMORA, 2009).

Alguns destes ésteres podem ser transformados pela levedura, durante a fermentação alcoólica, em ácidos graxos por meio da síntese de *Linnen*, sendo relacionados aos defeitos, apresentando descritores gerais de aroma de queijo, oleoso e gorduroso. A presença de ácidos graxos de cadeia média no meio, pode levar a paradas de fermentação, pois ocorre uma ligação desses ácidos graxos com as paredes celulares das leveduras, impedindo as trocas entre microrganismo e meio (GENEIX, 1983; RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

Quando um composto possui um grupo hidroxila ou mais, ligados diretamente a um anel aromático chamado fenol, é designado composto fenólico; semelhantes aos ácidos fenólicos são reconhecidos por possuírem um radical carboxila em vez de uma hidroxila (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Sendo importantes para a indústria de bebidas alcoólicas, em especial a vinícola, pois estão relacionados seja de maneira direta ou indireta com à qualidade da bebida, principalmente nos aspectos de cor e adstringência. (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

O perfil fenólico do hidromel está diretamente ligado aos ingredientes adicionados durante a mosturação e fermentação do produto. Porém, o mel utilizado como matéria-prima é uma fonte significativa de compostos fenólicos,

contudo a concentração e o teor desse perfil dependem da origem e do tipo de mel empregado (WIECZOREK *et al*., 2014). Tendo correlação com a localização geográfica dos apiários, pois elevadas temperaturas podem ocasionar acúmulos de compostos fenólicos, além da diversidade da flora conferindo a estes produtos atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica (KÜÇÜK *et al*. 2007). Essas últimas características demonstram que esses compostos também são de interesses nutricional e farmacológico (RIBERÉAU-GAYON *et al*., 2003). Oliveira *et al*. (2012), apontou em suas análises que méis de cor escura possuem maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Diferentes estudos têm mostrado que o mel pode ser inserido na dieta como maneira de prevenção de algumas doenças crônicas, incluindo câncer (melanoma, colorretal, câncer de próstata, renal, de bexiga e câncer nos ossos), além de doenças cardiovasculares, do trato gastroinstestinal e neuroinflamações (EL-SEEDI *et al*., 2019; ETERAF-OSKOUEI e NAJAFI, 2013; KHAN; ABADIN e RAUF, 2007; MANDAL e MANDAL, 2011; SAMARGHANDIAN; FARKHONDEH e SAMINI, 2017;). Além disso foi reportado que o mel é capaz de reduzir a oxidação das hemácias humanas (ALVAREZ-SUAREZ *et al*., 2012; BLASA *et al*., 2007;). Essas propriedades benéficas do mel são transferidas ao hidromel durante a fermentação, aumentando assim as características positivas e funcionais da bebida, podendo essas características serem potencializadas com o acréscimo de frutas, oleaginosas e até mesmo ervas à produção (ŠVECOVÁ *et al*.,2015).

Ao menos 5000 flavonoides e ácidos fenólicos foram descritos em amostras de méis, utilizando-se de diferentes técnicas de análise (PYRZYŃSKA e BIESAGA, 2009). Dentre os principais compostos fenólicos encontrados em méis destacam-se os ácidos: caféico, p-cumárico, gálico, vanílico, siríngico, clorogênico, 4-(dimetillamino) benzoico; já dentre os flavonoides: apigenina, genisteína, pinocembrina, crisina, quercetina, luteolina, kaempferol, galangina e pinobanksina (CIANCIOSI *et al*., 2018).

Em produtos podem ser analisada uma gama enorme de compostos, que vão desde moléculas simples até complexos polímeros, essa variância de estrutura ocorre pois os compostos são muito reativos, em especial durante o processo fermentativo, com tendência a estabilidade durante o armazenamento. As hidroxilas associadas às propriedades nucleofílicas dos anéis fenólicos

promovem as reações de oxidação, adição, polimerização, condensação e copigmentação durante todo o processo de elaboração (CHEYNIER *et al*. 2006; ES-SAFI *et al*. 2002).

Os ácidos hidrocinâmicos: ferrúlico, caféico e para-cumárico, são ácidos fenólicos presentes no mel (PEREIRA *et al*., 2009). Estes ácidos participam das reações de escurecimento do mosto e do vinho, mosto já fermentado (CHEYNIER *et al*., 2006; RIBERÉAU-GAYON *et al*., 2003). Os ácidos fenólicos são incolores quando diluídos em solução alcoólica, mas tornam-se amarelos quando oxidados (RIBERÉAU-GAYON *et al*., 2006). Na presença de *Brettanomyces* podem vir a interferir negativamente no aroma, é o caso do ácido cumárico e ácido ferrúlico, que são precursores de fenóis voláteis (RIBÉREAU-GAYON *et al*., 2021).

Durante a fermentação os ácidos cumárico e ferrúlico podem dar origem a outros compostos fenólicos (Tabela 5). No caso específico do 4-vinil-fenol e 4-vinil-guaiacol, essa transformação acontece pela descarboxilação provocada pela levedura, durante a fermentação e passam por uma rápida redução, gerando 4-etil-fenol e 4 etil-guaiacol. (ALBAGNAC, 1975; CHATONNET *et al*., 1993; DUGELAY *et al*., 1992).

Tabela 5 - Ácidos fenólicos e seus subprodutos e limiar de concentração.

Composto	Produto	Limiar(mg/L)
Ácido cumárico	4-vinil-fenol	<0,02 mg/L
	4 -etil-fenol	<0,6mg/L
Ácido ferrúlico	4-vinil-guaiacol	<10mg/L
	4-etil-guaiacol	<0,11 mg/L

Fonte: ALBAGNAC, 1975 (adaptado); DUGELAY *et al*., 1992; CHATONNET *et al*., 1993; SWIEGERS *et al*., 2005; FRANCIS e NEWTON, 2005.

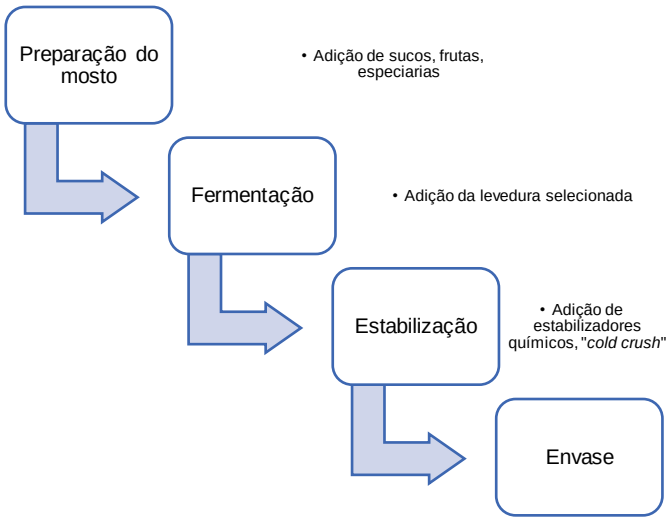
4.4.3 Fermentação de hidromel

A fermentação alcoólica é uma das quatro principais etapas envolvidas na elaboração do hidromel (Figura 10).

Primeiramente o mosto é preparado, de acordo com o estilo de hidromel desejado pelo produtor, normalmente há uma adição de nutrientes que favorecem o crescimento da levedura e otimização a fermentação, geralmente essa mistura é composta de nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e minerais. Alguns estudos (PEREIRA *et al*., 2013; 2014, 2015 e 2017; ROLDÁN *et al*., 2011,

WINTERSTEEN; ANDRAE e ENGESETH, 2005) mostram que a faixa ideal de sólidos solúveis presentes no mosto, que deve ser entre 20 e 23 °Brix, pois assim é facilmente alcançados os teores alcoólicos compreendidos entre 8 e 12% (v/v). Também é durante a preparação do mosto que o mesmo deve ser corrigido, principalmente quanto ao pH, seja para obter um melhor equilíbrio entre doçura e acidez, seja para criar um ambiente que favoreça o crescimento da cultura desejada, para isso se utiliza, normalmente, os ácidos cítrico, málico ou tartárico. (PEREIRA *et al*.,2009, 2013; 2014, 2015 e 2017; ROLDÁN *et al*., 2011; SROKA e TUSZYŃSKI, 2007).

Figura 10 - Fluxograma básico da produção de hidromel



Fonte: Autoria própria.

Na indústria de hidroméis, o mosto, após suas correções, é inoculado com cepas de leveduras desejadas, tendo em vista o aporte organoléptico dado pelo microrganismo, normalmente são estirpes selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae,* porém essas cepas foram desenvolvidas para a indústria vinífera e/ou cervejeira, não sendo características para a produção de *mead*, o que faz com que os produtores acabem enveredando pelo caminho da tentativa e erro, não sendo rara as vezes que a fermentação não ocorre de maneira desejada, podendo ocorrer de maneira mais lenta, interrompida ou até mesmo surgimento de aromas e/ou sabores indesejáveis (RAMALHOSA *et al*., 2011). Normalmente, estão associados com a incapacidade de resposta das leveduras para se adaptarem às condições de estresse desfavoráveis ao seu crescimento, fazer uma análise da resistência ao estresse para selecionar a levedura a ser utilizada

é uma alternativa para a otimização do procedimento (MILESKI, 2016; ZUZUARREGUI e DEL OLMO, 2004).

A fermentação de hidromel ocorre na faixa de temperatura de 22°C a 25°C, com monitoramento frequente, para evitar a interrupção da fermentação. Esse processo não possui um tempo determinado de duração, isso ocorre pois são muitas as variáveis que vão influenciar diretamente na velocidade e duração: tipo de mel, nutrientes do mosto, levedura utilizada, quantidade de levedura, condições fermentativas. Após a fermentação completa, o hidromel é estabilizado, com estabilizadores químicos e/ou procedimentos térmicos, como o *cold crush*, e em alguns casos pode ocorrer o *back sweetening*, que é a adição de mel ao hidromel finalizado para que seja alcançado o parâmetro de doçura proposto ao hidromel, para então ocorrer a clarificação, filtração e por fim o engarrafamento (PEREIRA, 2016).

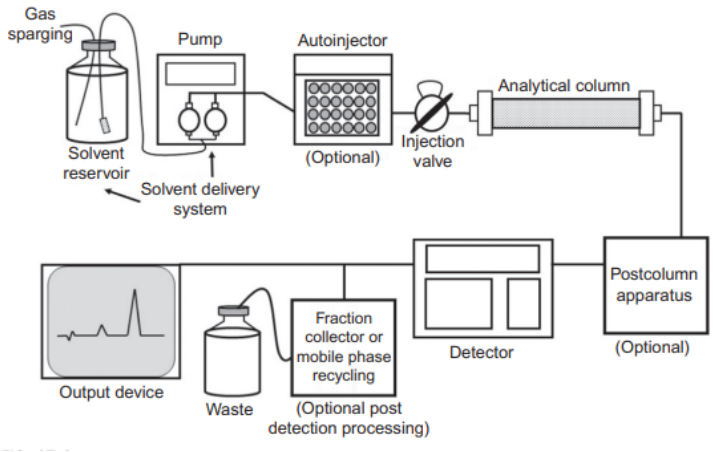
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Cromatography* (HPLC)é um método de análise que vem sendo altamente difundido nos últimos 50 anos (SANCHES *et al*. 2003), tendo como fator determinante de destaque a sua capacidade identificar e quantificar substâncias solubilizadas nos mais diversos meios (SKOOG *et al*., 2006; LANÇAS, 2013). Em amostras de bebidas, alcoólicas ou não, essa técnica tem ganhado espaço, principalmente por ser eficiente para separar e até mesmo isolar pigmentos antociânicos, flavonoides e ácidos fenólicos (LOPES *et al*., 2007). A CLAE é um tipo de cromatografia que emprega duas fases, sendo uma a estacionária (FE) e a outra móvel (FM); a FE são colunas preenchidas com sólidos ou semirrígidos que possuam partículas porosas de diferentes diâmetros e suportem pressões de até 350 bar, enquanto a FM passa por uma eluição a alta pressão, sendo utilizado solventes que apresentem características específicas: solubilização da amostra sem que haja interação química entre ambas, apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, isenção de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso, apresentar compatibilidade com o detector empregado, além da polaridade adequada para a separação dos compostos (DEGANI *et al*.,1998; PERES, 2002).

A CLAE é reconhecida por sua alta resolução, eficiência e detectabilidade, além de utilizar uma pequena quantidade de amostra, possibilitando sua aplicação nos mais diversos experimentos (COLLINS; BRAGA; BONATO,2006; SKOOG *et al*., 2006). O sistema cromatográfico é composto, basilarmente, de: reservatório de fase móvel; uma bomba de alta pressão que proporciona ao sistema vazão contínua, sem pulsos, para eluição da fase móvel; válvulas de injeção da amostra; coluna cromatográfica, reaproveitáveis e devem ser de material inerte e resistente; um detector que pode ser de diferentes tipos; e um registrador dos dados obtidos (Figura 11) (LACOURSE & LACOURSE, 2017).

A coluna é componente fundamental na análise cromatográfica, sendo responsável pela separação dos componentes químicos. Essas são comumente construídas em aço inoxidável, com interior, na maioria das vezes, de sílica com partículas apresentando de 3 a 10 µm de diâmetro. Entre os tipos de cromatografia utilizados, destacam-se a cromatografia em fase normal, a FE é mais polar que a FM; e em fase reversa, na qual a FM é mais polar. A cromatografia em fase reversa vem sendo mais utilizada atualmente, por empregar FMs aquosas, sendo a coluna do tipo C18 (octadecilsílica) a mais usada (DEGANI *et al*., 1998; SKOOG *et al*., 2006). Na coluna as substâncias acabam passando por um processo de separação, primeiramente com a eluição das substâncias com maior afinidade pela FM, ficando retidos os compostos que interagem com maior interação com a FE.

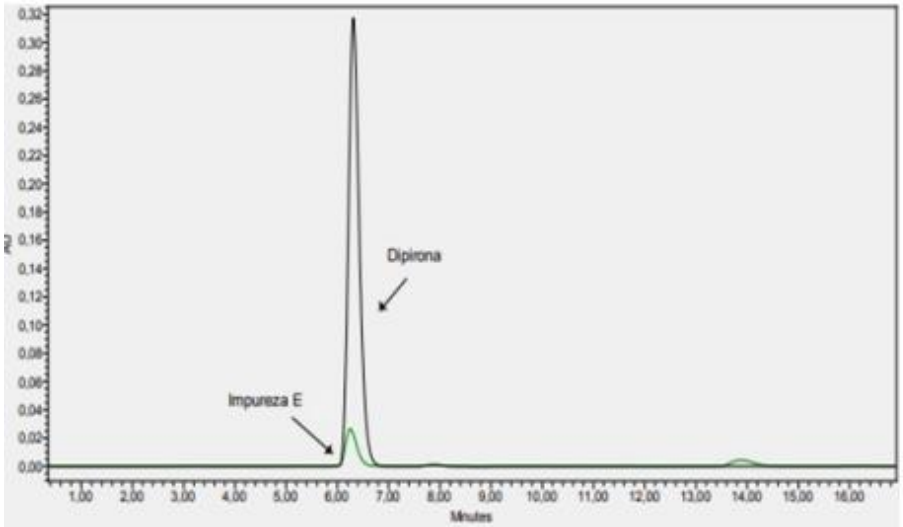
Figura 11 – Esquematização de CLAE



Fonte: LACOURSE & LACOUSE, 2017

As amostras que passaram sem retenção pela coluna são então direcionadas para o detector, que gera um sinal proporcional à concentração do analito e é enviado para um sistema de aquisição de dados, que esquematiza as informações num cromatograma, que mostra a corrida cromatográfica (Figura 12) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS, 2013).

Figura 12 – Exemplo de Cromatograma obtido em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



FONTE: MACHADO, 2020

O sistema de detecção mais adequado deve ser escolhido de acordo com a natureza da amostra. Nesse estudo foi utilizado o sistema de detecção de absorção da radiação ultravioleta ou visível (UV-Vis). Nesse caso, as substâncias analisadas devem possuir a capacidade de absorbância da energia proveniente de comprimentos de onda da região do ultravioleta ou visível no espectro da luz. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG *et al*., 2006; SUGIOKA, 2009). Os espectros de UV-Vis de substâncias, como flavonoides e outros fenólicos, são alterados pelas variações em suas estruturas químicas, facilitando a diferenciação entre os analitos das amostras, porém esse método de detecção apresenta como ponto negativo a falta de informação estrutural, que possibilita a interferência da matriz das amostras (presença de compostos quimicamente semelhantes) e à identificação errada de picos (YILMAZ e TOLEDO, 2004; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Matérias-primas para o hidromel

- *Mel*

Os méis utilizados no estudo foram obtidos da cooperativa “Associação dos Apicultores do Município de Serra Talhada e Adjacência”, de nome fantasia Casa do Mel. As coletas foram realizadas nos apiários localizados nas cidades do Sertão do Pajeú pernambucano de Serra Talhada (7°59'7"S, 38°17'34"O) e Triunfo (7°50′26″S, 38°6′1″O). Os méis fornecidos foram o mel escuro (Serra Talhada) e mel claro (Triunfo), designados pela cooperativa como AP 14 e AP 15, respectivamente, sendo ambos os méis provenientes de apicultura, multifloral, sem beneficiamento ou suplementação e com a coleta realizada em janeiro de 2022.

- *Água*

A água utilizada teve parâmetros em conformidade com as regulamentações impostas para a indústria de alimentos e a Instrução Normativa 34, de 29 de novembro de 2012, responsável pela identidade e qualidade das bebidas fermentadas, que preconiza que a água utilizada deve estar condicionada ao padrão da graduação alcoólica final (BRASIL, 2012).

- *Leveduras*

Saccharomyces cerevisiae

Para o presente estudo foram utilizadas 7 leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 6) obtidas comercialmente. As leveduras foram selecionadas pelo aporte sensorial de cada uma, a tolerância alcoólica e a faixa de temperatura ideal para fermentação. A exceção quanto a faixa de

temperatura é a Lallemand Diamond, que foi incluída no experimento por não ter grande influência no aroma e sabor do fermentado, deixando assim que o *bouquet* aromático seja quase que exclusivamente do mel ou blend de mel.

Tabela 6 - Leveduras *Saccharomyces* pré-selecionadas para o estudo.

CÓDIGO	NOME	ΔT (°C)	TOLERÂNCIA(%ABV)
S01	Saf-Instant Panificação	25-30	-
S02	Indupropil Ca-11	24-32	11-15
S03	Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus*	10-15	7
S04	Red Star Premier Montrachet	15-30	13
S05	Lallemand Belle Saison – Saison Styles	15-35	14
S06	Diastaticus Renaissance TR313	14-25	16
S07	Lalvin k1v-1116	10-35	18

ΔT: faixa de temperatura de fermentação; TOLERÂNCIA (%ABV): tolerância alcóolica por volume.

Não-Saccharomyces

Foram utilizadas cepas de *Torulopsis dattila* (*Lachancea thermotolerans*), *Hansenula anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*) e *Brettanomyces* (Tabela 7). Tendo em vista o uso recorrente em produção cervejeira e vinícola, bem como estudos de fermentação mista. (DOMIZIO *et al*., 2016; OSBURN *et al*., 2018; DA SILVA, 2021).

As referidas leveduras, com exceção da *Brettanomyces,* que foi adquirida comercialmente, foram cedidas pela Micoteca/CCB (UFPE) para a presente pesquisa.

Tabela 7 - Leveduras não-*Saccharomyces* pré-selecionadas para o estudo

CÓDIGO	CEPA	ESPÉCIE
NS01	*URM 3981*	*Wickerhamomyces A1*
NS02	L2-LSOG	*Lachancea thermotolerans*
NS03	Levteck Blend Brasil	*Brettanomyces bruxelensis*
NS04	Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Bélgica	*Brettanomyces bruxelensis*
NS05	*Brettanomyces bruxelensis*	*Brettanomyces bruxelensis*
NS06	*URM 3989*	*Wickerhamomyces A1*

Fonte: Autoria própria (informações obtidas com os fornecedores).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Produção do hidromel

a) Pré inóculo

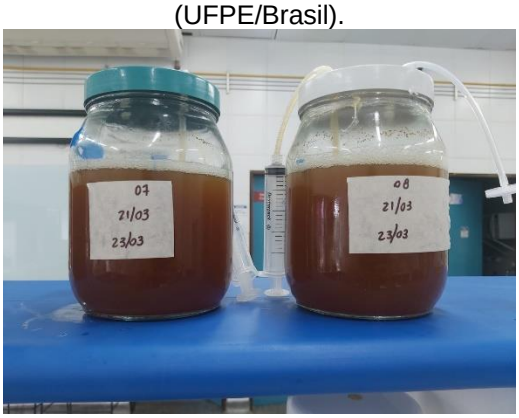
As leveduras passaram por processo de replicação, onde foram utilizadas técnicas estéreis de transferência em meio de cultura YPD. O meio após ser preparado e autoclavado a 121º C por 15 minutos foi resfriado em banho termostático invertido até atingir a temperatura ambiente de 28º C para as *Saccharomyces* e 30º C para as não-*Saccharomyces*, momento no qual ocorreu a inoculação das leveduras. Decorrido o período de 36 horas, as leveduras (10 % v/v) foram transferidas para o meio de cultura celular (90 % v/v), composto pelo *blend* de mel diluído em água destilada na proporção de 30 %(v/v), permanecendo assim por 48 horas.

b) Mosto e inoculação

Para a preparação do mosto, os méis AP 14 e AP 15 foram misturados num *blend* na proporção 1:3 (v/v), respectivamente. O *blend* com 90 °Brix foi diluído a 30 % v/v com água destilada, para obtenção do meio fermentativo com 26º Brix (mosto). Esse mosto foi aquecido até temperatura de ebulição, e permaneceu nesse estado por 15 minutos, posteriormente, ainda quente, foram transferidos volumes de 0,9 L para os tanques de fermentação, desenvolvidos (Figura 13), permanecendo assim até que atingissem a temperatura do recinto, 32º C para inoculação das leveduras *Saccharomyces* e 24,6º C das não-*Saccharomyces*. Após o resfriamento o mosto foi inoculado com 0,1 L do meio

de propagação. Não foi feita nenhuma suplementação, correção ou controle de temperatura no meio fermentativo, tendo a fermentação ocorrida de acordo com a temperatura ambiente.

Figura 13 - Tanque de fermentação (1,5L) desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos (UFPE/Brasil).



Fonte: Autor.

A fermentação foi conduzida até que não houvesse variação significativa na concentração de sólidos solúveis (°Brix). Durante a fermentação, foram retiradas amostras a cada 24 horas para a determinação de pH, sólidos solúveis (SS), açúcares redutores e viabilidade celular. A interrupção da fermentação foi dada após 48 horas sem alteração dos sólidos solúveis, totalizando 72h sem variação significativa.

5.2.2 Análises microbiológicas e físico-químicas

a) Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por contagem de levedura em Câmara de Neubauer espelhada (Almonacid *et al.* 2012), por microscopia ótica (Nikon Eclipse E200). A solução de azul de metileno 0,02 % p/v foi utilizada para a identificação de células viáveis, e o percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade celular}(\%) = \frac{\text{células vivas x } 100}{\text{células totais}}$$

b) Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados por método espectrofotométrico, no comprimento de onda de 540 nm, utilizando como

reagente de redução o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como proposto por Miller (1959). Para a determinação utilizou-se espectrofotômetro (Astral Científica®, Paraná, Brasil) e cubetas de vidro, com percurso ótico de 10 mm.

c) Concentração de sólidos solúveis

A medida de concentração de sólidos solúveis no mosto foi realizada em refratômetro de bancada (ABBE-RMT; Bel Engineering) e expressa em °Brix (AOAC, 2000).

d) pH

O pH foi mensurado usando um eletrodo, acoplado a um pHmetro digital (TECNOPON mPA 210ª), previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 2000).

e) Teor alcoólico

O teor alcoólico foi obtido a partir dos dados da análise de sólidos solúveis, utilizando-se o *software* computacional *Brewer's Friend* (CERVEJARIA FALLER, 2021), que apresenta a concentração de álcool mediante dados obtidos por análise de sólidos solúveis em refratômetro.

f) Identificação de compostos fenólicos

Para identificar os compostos fenólicos foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ambsorção molecular UV/Vis. As condições cromatográficas seguiram metodologia de Lima *et al*. (2011), com ajustes: coluna cromatográfica Acclaim® 120 Dionex C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), com fluxo da fase móvel 0,6 $mL.min^{-1}$, temperatura do forno de 36º C, volume de injeção de 20µL e comprimentos de onda de 290nm (ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido siríngico) e 304nm (ácido *p*-cumárico, rutina, miricetina e quercetina). A fase móvel foi constituída pela solução A (ácido fosfórico, 0,5% em água Milli-Q®:metanol (90:10)) e solução B (ácido fosfórico, 0,5% em água Milli-Q®:metanol (10:90)), em sistema gradiente das soluções A e B foi realizada: 0 a 25 min, 0 a 20 % B; 25 a 35 min, 20 a 25 % B; 35 a 55 min, 25 a 55% B. A identificação dos compostos ocorreu pela comparação do perfil cromatográfico e tempo de retenção das amostras com soluções de 10 µg/mL dos compostos analisados em metanol. As amostras de hidromel foram filtradas

a 0,45 µm antes da injeção cromatográfica (LIMA *et al*., 2011; PORGALI e BYUKTUNCEL, 2012).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos em triplicata e apresentados como média e desvio-padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Duncan ($p<0,05$), utilizando o programa Microsoft Excel.

6 REFERÊNCIAS

ABBEY, E. L.; RANKIN, J. W. Effect of quercetin supplementation on repeated-sprint performance, xanthine oxidase activity, and inflammation. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 21, n. 2, p. 91-96, 2011. doi: 10.1123/ijsnem.21.2.91.

ABE, L. T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ADEBO, O. A; MEDINA-MEZA, I. G. Impact of Fermentation on the phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A mini review. **Molecules** v. 25, n. 4, p 927, 2020. doi: 10.3390/molecules25040927.

AGUILERA, F. *et al*. Relationship between ethanol tolerance, H -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 34-42, 2006. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002.

AKALIN, Hüsne; BAYRAM, Mustafa; ANLI, R. E. Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 167-174, 2017. **doi:10.1002/jib.396**.

ALEXANDRE, H., *et al*. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and Kloeckera apiculata. **FEMS Microbiology**. Lett., 124, p.17–22, 1994. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x.

ALMEIDA, Ana Filipa Fernandes de. **Estudo da aplicação de diferentes culturas microbiológicas à produção de cerveja artesanal**. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Universidade do Minho (Portugal), Minho, 2017.

ALVAREZ-SUAREZ, José M. *et al*. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1508-1516, 2012. DOI: 10.1016/j.fct.2012.01.042.

ALMONACID, Sergio F. *et al*. A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 750-758, 2012. DOI:10.1007/s11947-010-0379-4.

AMERINE, M. A.; ROESSLER, E. B. **Wines: their sensory evolution**. São Francisco, USA: W. H. Freeman and Company, 1983. 432 p.

ANDREWS, B. J.; GILLILAND, R. B. Super-attenuation of beer: a study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 58, n. 3, p. 189-196, 1952. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.1952.tb02675.x. Acesso em: 21/maio/2022.

AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of aoac international**. 17th etd., AOAC International, Arlington, 2000.

APONTE, M.; BLAIOTTA, G. Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG. **Frontiers Microbiology**. v.7, p. 809, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00809.

ARGOLLO, C.B.N.T. **Perfil físico-químico, concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de hidroméis produzidos a partir de leveduras selvagens e suplementados com diferentes ativantes**. 2020. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – UFBA, Salvador, 2020.

AZAY-MILHAU, J. *et al*. Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (Cichorium intybus L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 755–760, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.046.

BAI FLAGFELDT, Dongmei *et al*. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, n. 10, p. 545-551, 2009. **doi: 10.1002/yea.1705**.

BALIKCI, E. K. *et al*. Influence of Lachancea thermotolerans on cv. Emir wine fermentation. **Yeast**, v. 33, n. 7, p. 313-321, 2016. DOI: 10.1002/yea.3166.

BARROS, Alexandre Rands. Apicultura: Relatório setorial integrante do Projeto “Economia de Pernambuco: Uma Contribuição para o Futuro”. Governo do Estado de Pernambuco, Secretaria de Planejamento, **PROMATA**. Recife, 2005. Disponível em: <http://www2.cedes.pe.gov.br/c/ document_library/get_file?p_l_id=14276&folderId=206515&name=DL FE-13565.doc>. Acesso em: 20 abr. 2021.

BARZEGAR, Abolfazl. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. **Molecular biology research communications**, v. 5, n. 2, p. 87-95, 2016.

BECHO, Juliana Raso Marques; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha De Oliveira. Rutina–estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2009.

BEHRENS, J. Análise sensorial de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Indústria de Bebidas**: Inovação, Gestão e Produção. São Paulo: Edgard Blucher, 2011. cap. 9, p. 183-213.

BENITO, Á. *et al*. Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of Lachancea thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**. v. 54, n.2, p.135–144, 2016. doi: 10.17113/ftb.54.02.16.4220.

BENITO, S. *et al*. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. **European Food Research Technology**. v. 241, n.5, p. 707–717, 2015. doi:10.1007/s00217-015-2497-8.

BERGAMO, G. *et al*. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International,** v. 116, p. 745-754, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.09.007.

BERGIN, S. A. *et al*. Identification of European isolates of the lager yeast parent *Saccharomyces* eubayanus. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foac053, 2022. DOI: 10.1093/femsyr/foac053.

BERRY, B. The Global Mead Market: Opportunities for canadian mead exporters. Agriculture and agri-food Canada. **Agri-food trade service. Government of Canada**, 2007. Disponível em: < http://www.ats.agr.gc.ca/info/4347-eng.htm >. Acesso em 16 jun. 2021.

BEZERRA-FILHO, C. S. M. *et al*. Therapeutic potential of vanillin and its main metabolites to regulate the inflammatory response and oxidative stress. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 19, n. 20, p. 1681-1693, 2019. doi: 10.2174/1389557519666190312164355.

BIAN, Yan *et al*. Natural polyphenols targeting senescence: A novel prevention and therapy strategy for cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 684, 2020. **doi:10.3390/ijms21020684**.

BLASA, M. *et al*. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food Chemistry**, 104, 1635-1640, 2007. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.03.014.

BLOCK, D. E.; BISSON, L. F. Ethanol tolerance in *Saccharomyces*. *In:* CIANI, M. (Org.). **Biodiversity and biotechnology of wine yeasts.** Trivandrum: Research Signpost. 2002. p 85–98

BOGDANOV, Stefan. External Applications of Honey. *In*: CRANE, Eva (Org.) **Book of Honey**. Mytholmroyd: Northern Bee Books. 2009. Chapter 8.

BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industial**, v. 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 288p.

BOULTON, C., QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 672p.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Portaria n. 229, **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA)**, 1988.

BRASIL. **Decreto no 6.871, de 4 de junho de 2009**.Brasil,2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal., **Brasil**, 2017.

BRASIL. IN nº 24 de 08 de setembro de 2005. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. Revoga a portaria nº 77 de 27 de novembro de 1986. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA),** 2005.

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 34, De 29 De Novembro De 2012. **Diário Oficial da União**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012. BRASIL, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 out. 2000, Seção 1, p. 23.

BRIGGS, D.*et al*. **Brewing: science and practice** (Vol. 108). New York: Woodhead Publishing, 2004. 863p.

BRUGNEROTTO, P. *et al*. Características físico-químicas e composição química de mel de melato de bracatinga: uma revisão. *In* OLIVEIRA JÚNIOR, J.M.B, CALVÃO, L. B (Org.). **A arte de criar abelhas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 25-39.

BRUNELLI, L. T. **Caracterização físico-química, energética e sensorial de hidromel**. 2015. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Botucatu, 2015.

CAMPBELL, Neil.A. *et al*. **Biologia de Campbell** 12ª. ed. Porto Alegre: Artmed. 2022. 1488p.

CANONICO, L. *et al*. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with diferente *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**. v. 259, p. 7-13, 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017.

CAPECE, A. *et al*. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018. **doi:10.3390/fermentation4020038**.

CARVALHO, L.C.M., SATO, S. Fermentação Descontinua Alimentada. In: SCHMIDELL, Willibaldo *et al*. (Org.). **Biotecnolgia Industrial**: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p 205-222.

CASEY, G. P.; INGLEDEW, W.M. M. Ethanol tolerance in yeasts. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 219-280, 1986. DOI: 10.3109/10408418609108739.

CECI, Claudia *et al*. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. **Nutrients**, n. 10, v. 11, p. 1756. 2018. doi: 10.3390/nu10111756

CERDÁN, T. G.; GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with diferente composition. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 349-356, 2004. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2004.01.032.

CERVEJARIA FALLER. **Calculadora**. Disponível em:< https://cervejariafaller.com.br/calculadora/>. Acesso em: 20/maio/2022.

CHAROENCHAI, C. *et al*. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes**. Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 1, p. 2-8, 1997. **doi:10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x**.

CHATONNET, P. *et al*. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 2, p. 191-202, 1993. DOI: 10.1002/jsfa.2740620213.

CHEN, C. *et al*. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 4, p. 303-308, 2013. **doi:10.1002/jib.95**.

CHEN, Y. *et al*. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0509-4.

CHEYNIER, V. *et al*. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. *In:* ANDERSEN,Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids in wine**. Abingdon: Routledge. 2006.p. 263-318.

CIANCIOSI, D. *et al*. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2322, 2018. doi: 10.3390/molecules23092322.

CIANI, M. *et al*. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 642, 2016. https://DOI:10.3389/fmicb.2016.00642

CIANI, Maurizio; BECO, Luca; COMITINI, Francesca. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 2, p. 239-245, 2006. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012.

COLEMAN, M. C.; FISH, Russel.; BLOCK, D. E. Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5875-5884, 2007. doi: 10.1128/AEM.00670-07.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S (Org.) **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP. 2006. p. 424-428.

COMBINA, Mariana *et al*. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **International journal of food microbiology**, v. 99, n. 3, p. 237-243, 2005. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017.

COMITINI, Francesca *et al*. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 873-882, 2011. DOI: 10.1016/j.fm.2010.12.001.

COUTINHO, Úrsula Tereza Cordeiro. **Eficácia da atividade fermentativa para produção de cerveja da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada com alginato de cálcio.** 2020. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

CRANE, E. **O livro do mel**, 2. Ed. São Paulo: Nobel. 1985. 226 p.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.

DA SILVA, STEFANO SABINO VIVAS. **Seleção de leveduras não convencionais e não comerciais para produção de cervejas por**

fermentação pura, mista e sequenciada com *Saccharomyces* cerevisea. 2021. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021.

DE GÓES-FAVONI, S. P. *et al*. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018. doi:10.6008/CBPC2179-6858.2018.004.0023.

DE SOUSA, A. V. B. *et al*. Determinação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da cajuína e do mel produzidos no Estado do Piauí-Brasil. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 2, p. 21-32, 2018. doi:10.17564/2316-3798.2018v6n2p21-32.

DEQUIN, Sylvie. The potential of genetic engineering for improving brewing, winemaking and baking yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, p. 577-588, 2001. DOI: 10.1007/s002530100700.

DEVI, K. P. *et al*. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. **Life sciences**, v. 142, p. 19-25, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.004.

DING, Sujuan *et al*. The protective effect of polyphenols for colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1407, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.01407.

DOMIZIO, P. *et al*. Lachancea thermotolerans as an alternative yeast for the production of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 599-604, 2016. **doi:10.1002/jib.362**.

DU TOIT, Maret; PRETORIUS, I. S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Vol. 21, n.1, p. 74-96. 2000. doi:10.21548/21-1-3559.

DUGELAY, I. *et al*. Formation of volatile phenols from cinnamic precursors during winemaking: The role of cinnamoyl esterase from commercial enzymic preparations. *In*: SCHREIER, P., WINTERHALTER, P. **Progress in flavour precursor studies**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1992. p.189-193.

EIZAGUIRRE, J. I. *et al*. Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces* eubayanus) in Patagonia. **Environmental microbiology.** vol. 20, n.10, p.3732-3743. 2018. doi:10.111/1462-2920,14375.

EL-SEEDI, H. R. *et al*. Honeybee products: An updated review of neurological actions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 17-27, 2020. Doi: 10.1016/j.tifs.2020.04.026.

ERASMUS, D. J.; VAN DER MERWE, G. K.; VAN VUUREN, H. J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 4, p. 375-399, 2003. DOI: 10.1016/S1567-1356(02)00203-9.

ERRATT, J. A.; STEWART, G. G. Fermentation studies using *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* yeast strains. **Developments in Industrial Microbiology.** v. 22, p. 577-586, 1981.

ESCRIBANO, Rocío *et al*. Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. **Journal of food science and technology**, v. 54, n.6, p. 1555-1564, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2587-7.

ES-SAFI, Nour-Eddine; CHEYNIER, Véronique; MOUTOUNET, Michel. Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5586-5595, 2002. DOI: 10.1021/jf025504q.

ETERAF-OSKOUEI, Tahereh; NAJAFI, Moslem. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 6, p. 731, 2013.

ETIÉVANT, Patrick X. Wine. In: MAARSE, Henk (Org.). **Volatile compounds in foods and beverages**. New York: Routledge, 2017. p. 483-546

FAY, Justin C.; BENAVIDES, Joseph A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS genetics**, v. 1, n. 1, p. e5, 2005. doi: 10.1371/journal.pgen.0010005.

FERRAZ, F. O. **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. 2015. 129f. Tese (Doutorado em biotecnologia industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

FERREIRA, W. F. C. *et al*. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel, 2010. 368p.

FIORI, Stefano *et al*. Biocontrol activity of four non-and low-fermenting yeast strains against Aspergillus carbonarius and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 45-50, 2014. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.020.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 11-22, 2003. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00245-9.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987-9003, 2013. DOI: 10.1021/jf402586f.

FORTES, J. P. *et al*. Enhancement of the Functional Properties of Mead Aged with Oak (Quercus) Chips at Different Toasting Levels. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 56, 2023. **doi:10.3390/molecules28010056**.

FRANCIS, I. L.; NEWTON, J. L. Determining wine aroma from compositional data. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 114-126, 2005. **doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x**.

FRESCO, P. *et al*. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 114-134, 2010. DOI: 10.2174/138161210789941856.

FUKUDA, Kiyoshi *et al*. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4076-4078, 1998. doi: 10.1128/aem.64.10.4076-4078.1998.

GAENSLY, Fernanda *et al*. Autochthonous yeasts with β-glicosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of Vitis labrusca grape must. **Journal of functional foods**, v. 19, p. 288-295, 2015. Doi: 10.1016/j.jff.2015.09.041.

GALLONE, Brigida et al. Genomics and evolution of beer yeasts. *In*: BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. **Brewing Microbiology Current Research, Omics and Microbial Ecology**. Poole: NA Bokulich. 2017. p. 145-178. doi:10.21775/9781910190616.06.

GALVINCIO, J. D. *et al*. Análise da variação da vegetação dos períodos secos e chuvosos por meio do Savi e Albedo de superfície no município de Belo Jardim – PE. REDE-**Revista Eletrônica do PRODEMA**, v. 10, n. 2, p.133-146, 2016. Disponível em: <http://www.revistarede.ufc.br/revista/index.php/rede/article/view/389/115>. Acesso em: 15 abr. 2021.

GANTER, P. F. Yeast and invertebrate associations. *In:* PÉTER, Gárbor; ROSA, Carlos. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. New York: Springer. 2006. p. 303-370.

GARCIA-CRUZ, C. H. *et al*. Determinação da qualidade do mel. **Alimentos E Nutrição Araraquara**, v. 10, n. 1, p. 23-25, 2009.

GATTO, M. T. *et al*. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 2, p. 269-272, 2002. doi: 10.1016/S0968-0896(01)00275-9.

GAYEVSKIY, Velimir; MATTHEW R. G. *Saccharomyces* eubayanus and *Saccharomyces* arboricola reside in North Island native New Zealand forests. **Environmental microbiology** vol. 18, n.4, p. 1137-1147, 2016. doi:10,1111/1462-2920,13107.

GENEIX, C. Effect des acides gras sur la viabilite des populations de *Saccharomyces cerevisiae*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v. 296, p. 943-947, 1983.

GILLILAND, R. B. Brettanomyces. I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavour. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, n. 3, p. 257-261, 1961.

GOBBI, Mirko *et al*. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. **Food microbiology**, v. 33, n. 2, p. 271-281, 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2012.10.004.

GOMES, Renata *et al*. Produção e qualidade de mel na zona da mata de Pernambuco. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, 2017.

GUAN, Yuanfang *et al*. Comparative gene expression between two yeast species. **BMC genomics**, v. 14, n.33, p. 1-13, 2013. Doi: 10.1186/1471-2164-14-33.

GUARDIA, T. *et al*. Anti-inflamatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, n.9, p. 683-687. DOI: 10.1016/s0014-827x(01)01111-9.

GUERRA, C.C. Vinho Tinto. In: VENTURINI FILHO, W. G (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010, cap. 11, p 209-233.

GUERRINI, S. *et al*. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on health-promoting compounds in wine. **Fermentation**. v. 4, n. 2, p. 1-14, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4020026**.

GUPTA, J. K.; SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. **Natural Product Radiance**, v. 8, p. 345–355, 2009.

HAHN, H. J. *et al*. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 740–748, 2016. doi: 10.5021/ad.2016.28.6.740.

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by Candida albicans**. International Immunopharmacology,** v. 9, p. 207-211, 2009. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.11.002.

HASSANZADEH, P. *et al*. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. **Life Sciences**, v. 179, p. 9–14, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.08.011.

HENDERSON, C. M.; BLOCK, D. E. Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 10, p. 2966-2972, 2014. doi: 10.1128/AEM.04151-13.

HIRALAL, Lettisha; OLANIRAN, A. O.; PILLAY, Balakrishna. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 117, n. 1, p. 57-64, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.002.

HOLM HANSEN, E. *et al*. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 541-547, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x.

HONG, Q. *et al*. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.01.005.

HRANILOVIC, Ana *et al*. The evolution of Lachancea thermotolerans is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0184652, 2017. https://DOI:10.1371/journal.pone.0184652.

HUANG, Wei-Pang; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. **Cell structure and function**, v. 27, n. 6, p. 409-420, 2002. DOI: 10.1247/csf.27.409.

HUTZLER, M. *et al*. Fermentation and spoilage yeasts and their relevance for the beverage industry-a review. **Brewing Science**, v. 65, n.3, p. 33-52, 2012.

HUTZLER, Mathias *et al*. A new hypothesis for the origin of the lager yeast *Saccharomyces* pastorianus. **FEMS Yeast Research**, v. 23, p. foad023, 2023. https://DOI:10.1093/femsyr/foad023.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Origem Animal**. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/ 9107-producao-da-pecuaria-municipal. htmL?edicao=29151&t=destaques>. Acesso em: 20 jun 2023.

IGLESIAS, Antonio *et al*. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12577-12590, 2014. DOI: 10.3390/molecules190812577.

JACKMAN, E.A.; BU´LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. Alcohol industrial. *In:* RATLEDGE, Colin; KRISTIANSEN, Bjornn (Org.) **Biotecnología básica**. Zaragoza: Acríbia, 2009. 577p.

JAISINGHANI, R. N. Antibacterial properties of quercetin. **Microbiology research**, v. 8, n. 1, p. 6877, 2017. DOI:10.4081/mr.2017.6877.

JEFFREY, A. E.; ECHAZARRETA, C. M. Medical uses of honey. **Revista Biomédica**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

JOLLY, N. P.; VARELA, Cristian; PRETORIUS, I. S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 2, p. 215-237, 2014. DOI:10.1111/1567-1364.12111.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with Lactobacillus cultures. **Animal Research and Development**, v. 20, n. 3, p. 7-22, 1984.

RIBEIRO JÚNIOR, M. R.; CANAVER, A. B.; BASSAN, C. F. D. Produção de hidromel: análise físico-química e sensorial. **Revista UNIMAR Ciências**, v. 24, n. 1-2, p. 59-63, 2017.

KAHOUN, D. *et al*. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1202, n.1, p. 19-33, 2008. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.06.016.

KAHOUN, David; ŘEZKOVÁ, Soňa; KRÁLOVSKÝ, Josef. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. **Food chemistry**, v. 219, p. 357-363, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.161.

KAPSOPOULOU, K. *et al*. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 735-739, 2007. DOI:10.1007/s11274-006-9283-5

KAWA-RYGIELSKA, Joanna *et al*. Fruit and herbal meads–Chemical composition and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 283, p. 19-27, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.040.

KHAN, F. R.; ABADIN, Z. Ul; RAUF, N. Honey: nutritional and medicinal value. **International journal of clinical practice**, v. 61, n. 10, p. 1705-1707, 2007. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01417.x.

KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. **Medicines**, v. 6, n.3, p. 94, 2019. DOI: 10.3390/medicines6030094.

KÜÇÜK, Murat *et al*. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.10.010

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 86–93, 2014. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002.

KURTZMAN, C. P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, Kluyveromyces and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygotorulaspora. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 3, p. 233-245, 2003. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00175-2.

KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of Pichia anomala to Wickerhamomyces anomalus. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 13-23, 2011. DOI: 10.1007/s10482-010-9505-6.

KURTZMAN, C. P. Pichia EC Hansen emend. Kurtzman. *In*: KURTZMAN, C.P; FELL, J. W. (Org.) **The yeasts**. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 273-352.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, Teun. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. 2354p.

LACHANCE, Marc-André; KURTZMAN, C. P. Lachancea Kurtzman. *In*: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, Teun. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 511-519.

LACOURSE, M. E.; LACOURSE, W. R. General instrumentation in HPLC. *In*: FANALI, Salvatore, *et al*. (Org.) **Liquid Chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 417-429. DOI:10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013. DOI:10.4322/sc.2013.005.

LANCIOTTI, Rosalba *et al*. Hansenula anomala as spoilage agent of cream-filled cakes. **Microbiological research**, v. 153, n. 2, p. 145-148, 1998. DOI: 10.1016/s0944-5013(98)80032-3.

LATORRE, M. *et al*. Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries. **Brewing Science**, v. 73, p. 51-57, 2020. DOI:10.23763/BrSc20-06latorre.

LEÃO, E. L. De S.; MOUTINHO, L. M. G.; XAVIER, M. G. P. Condicionantes de crescimento arranjo produtivo local de apicultura na região do Araripe, Pernambuco. **RACE-Revista de Administração, Contabilidade e Economia**, v. 11, n. 1, p. 75-102, 2012.

LI, Ruirui; SUN, Yuxia. Effects of honey variety and non-*Saccharomyces cerevisiae* on the flavor volatiles of mead. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 1, p. 40-53, 2019. DOI:10.1080/03610470.2018.1546072.

LI, W. *et al*. Biological activity evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.038.

LIBKIND, Diego *et al*. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1105430108.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vivo e in vitro, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi** (Caryocar brasiliense, Camb.). 2008. 219f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, 2008.

LIMA, N. E. F. **Perfil fenólico e atividade antioxidante de vinhos Goethe – Caracterização e evolução durante o armazenamento em garrafa**. 136 p. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), - Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

LIMA, Urgel de Almeida *et al*. **Biotecnologia industrial; processos fermentativos e enzimáticos**. 2 ed. São Paulo: Blucher, 2019. 760p.

LOPES, Rafaela *et al*. Caffeic acid phenolipids in the protection of cell membranes from oxidative injuries. Interaction with the membrane phospholipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1863, n. 12, p. 183727, 2021. DOI: 10.1016/j.bbamem.2021.183727.

LOPES, Toni *et al*. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

LÓPEZ, M. C.; MATEO, J. J.; MAICAS, Sergi. Screening of β-glicosidase and β-xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1696-C1704, 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.12954.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2006. 125f. Dissertacão (Mestrado em bioquímica agrícola) – Programa de Pós-Graduacão em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

MACHADO, P. V. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de dipirona sódica monoidratada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em química). UNIOESTE, Toledo, 2020.

MADRIGAL, Tania; MAICAS, Sergi; MATEO, Jose. Glucose and ethanol tolerant enzymes produced by Pichia (Wickerhamomyces) isolates from enological ecosystems. **American journal of enology and viticulture**, v. 64, n. 1, p. 126-133, 2013. DOI:10.5344/ajev.2012.12077

MANDAL, M. D.; MANDAL, Shyamapada. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60016-6.

MANZANARES, Paloma; RAMÓN, Daniel; QUEROL, Amparo. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β-D-xylosidase activity. **International journal of food microbiology**, v. 46, n. 2, p. 105-112, 1999. DOI: 10.1016/s0168-1605(98)00186-x.

MARCATO, D. C.. **Estudo da eficácia in vitro e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética**. 2019. 98f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). UNESP, Araraquara, 2019.

MASON, A. B.; DUFOUR, Jean-Pierre. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. **Yeast**, v. 16, n. 14, p. 1287-1298, 2000. DOI:10.1002/1097-0061(200010)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I.

MATTIETTO, R. A. *et al*. Tecnologia para Obtenção Artesanal de Hidromel do Tipo Doce. **Comunicado técnico 170,** EMBRAPA, Belém, p. 1–5, 2006.

MEIER-DÖRNBERG, Tim *et al*. *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? —spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 4, p. foy023, 2018. DOI: 10.1093/femsyr/foy023.

MEIER-DÖRNBERG, Tim *et al*. The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces* pastorianus strains for brewing. **Fermentation**, v. 3, n. 3, p. 41, 2017. **DOI:10.3390/fermentation3030041**.

MENDES-FERREIRA, Ana *et al*. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 193-198, 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016.

MENDONÇA, L. R. O; LIBERATO, M. C. T. C. Análise físico-química e biológica dos méis de abelha *Apis melífera L*. de diferentes floradas e produção de hidromel em escala laboratorial. **Produção Acadêmica do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará Volume**, p. 7.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n.4 , p. 673-751, 2000.

MIKOŁAJCZAK, Natalia; TAŃSKA, Małgorzata; OGRODOWSKA, Dorota. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 110-138, 2021. DOI:10.1016/j.tifs.2021.04.046.

MILESKI, J. P. F. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces***. 2016. 87f. Dissertação(Mestrado em tecnologia de alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI:10.1021/ac60147a030.

MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E. A.; COCOLIN, Luca. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4884-4893, 2002. oi: 10.1128/AEM.68.10.4884-4893.2002.

MOIO, Luigi *et al*. Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (Vitis vinifera L.) wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 891-897, 2004. DOI: 10.1021/jf034869n.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.

MONTEIRO *et al*. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. DOI:10.1590/S0100-40422005000500029 .

MORAES, L. F. **Guia de Estilos** – BJCP. Pompéia Hidroméis. 2014. Disponível em <https://pompeiahidromeis.com.br/2014/02/19/guia-de-estilos-bjcp/>. Acesso em: 16 jun 2021.

MORATA, Antonio *et al*. Lachancea thermotolerans applications in wine technology. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 53, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4030053**.

NAKAO, Yoshihiro *et al*. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes** vol. 16, n.2, p. 115-129, 2009. doi:10,1093/dnares/dsp003.

NALLY, M. C. *et al*. Evaluation of behaviour of Lachancea thermotolerans biocontrol agents on grape fermentations. **Letters in applied microbiology**, v. 67, n. 1, p. 89-96, 2018. DOI: 10.1111/lam.13001.

NARUKAWA, Masataka *et al*. Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39**. Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 405, n. 4, p. 620–625, 2011. Disponível em: https://DOI:10,1016/j.bbrc.2011.01.079.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventicular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 989-993, 2008. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2008.01.011.

NESPOLO, R. F *et al*. An Out-of-Patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces* eubayanus lineages. **PLoS genetics vol**. 16, n.5 p. e1008777, 2020. doi:10, 1371/journal.pgen.1008777.

OGAWA, Minami *et al*. Analyzing the minor volatilome of Torulaspora delbrueckii in an alcoholic fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 248, p. 613-624, 2022. DOI:10.1007/s00217-021-03910-y.

OLIVEIRA, P. S. *et al*. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de Melipona fasciculata, M. flavolineata (Apidae, Meliponini) e Apis mellifera (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728-1732, 2012. DOI:10.1590/S0100-40422012000900005.

OSBURN, Kara *et al*. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. **Food microbiology**, v. 70, p. 76-84, 2018. DOI:10.1016/j.fm.2017.09.007.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PADILLA, Beatriz; GIL, Jose V.; MANZANARES, Paloma. Challenges of the non-conventional yeast Wickerhamomyces anomalus in winemaking. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 68, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4030068**.

PADILLA, Beatriz; GIL, José V.; MANZANARES, Paloma. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 411, 2016. DOI:10.3389/fmicb.2016.00411.

PAIXÃO, J. N. V. **Estudo de metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* para produção de glutationa utilizando melaço de beterraba**. 2018. 120f. Dissertação(Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

PASSOTH, Volkmar *et al*. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast Pichia anomala. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 1, p. 3-13, 2006. DOI:10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x.

PEDDIE, H. A. B. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 5, p. 327-331, 1990. **DOI:10.1002/j.2050-0416.1990.tb01039.x**.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, A P. *et al*. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food microbiology**, v.33, n. 1, p. 114–23, fev. 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.006

PEREIRA, A. P. *et al*. Mead and Other Fermented Beverages. *In:* LARROCHE, Christian, et al. (Org.) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p.407-434. DOI:10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5.

PEREIRA, A. P. *et al*. Mead production: fermentative performance of yeasts entrapped in different concentrations of alginate. **Journal of the Institute of Brewing**, v.120, n. 4, p.575–580, 2014. DOI:10.1002/jib.175.

PEREIRA, A.P. et. al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. **LWT - Food Science and Technology**. v.56, n.1, p.21-30, abr.2014. DOI:10.1016/j.lwt.2013.11.005.

PEREIRA, A.P.*et al*. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n. 8, p. 2057-2063, 2009. DOI:10.1016/j.fct.2009.05.028.

PEREIRA, A. P. *et al*. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 114-123, 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.006.

PEREIRA, A. P. *et al*. Mead and other fermented beverages. *In*: LARROCHE, Christian, et al. (Org.) **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 407-434. DOI:10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5.

PEREIRA, A. P. *et al*. Mead production: fermentative performance of yeasts entrapped in different concentrations of alginate. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 575-580, 2014. **DOI:10.1002/jib.175**.

PEREIRA, A. P. *et al*. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2057-2063, 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.028.

PEREIRA, A. P. R. **Optimization of mead production: design of different strategies for improvement of alcoholic fermentation**. 2016. 24f. Tese (Doutorado em Ciências químicas e biológicas). Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2016.

PEREIRA, S. C. *et al*. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2015. DOI:10.1186/s13068-015-0224-0.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PERIS, David *et al*. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces* eubayanus and its lager-brewing hybrids. **Molecular ecology** vol. 23, n.8, p. 2031-2045, 2014. doi:10,1111/mec.12702.

PETRUZZI, Leonardo *et al*. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 995, 2017. DOI:10.3389/fmicb.2017.00995.

PIRES, E. J. *et al*. Yeast: The soul of beer's aroma—A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014. DOI:10.1007/s00253-013-5470-0.

PORGALI, Esra; BÜYÜKTUNCEL, Ebru. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 145-154, 2012. DOI:10.1016/j.foodres.2011.10.025.

POWELL, C. D. *et al*. Beer-spoiling yeasts: genomics, detection, and control. *In*: BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. **Brewing Microbiology Current Research, Omics and Microbial Ecology**. Poole: NA Bokulich. 2017.p. 289-327. DOI:10.21775/9781910190616.11

PRIEST, Fergus G.; CAMPBELL, Iain (Ed.). **Brewing microbiology**. London: Chapman & Hall, 1996. 399p.

PROCOPIO, S.; QIAN, F.; BECKER, T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage

fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 233, n.5, p. 721-729, 2011. DOI:10.1007/s00217-011-1567-9.

PUERTAS, B. *et al*. Use of Torulaspora delbrueckii and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 3, p. 733-746, 2017. DOI:10.1111/jam.13375.

PYRZYŃSKA, Krystyna; BIESAGA, Magdalena. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **TrAC trends in analytical chemistry**, v. 28, n. 7, p. 893-902, 2009. DOI:10.1016/j.trac.2009.03.015.

RAMALHOSA, Elsa *et al*. Mead production: Tradition versus modernity. **Advances in food and nutrition research**, v. 63, p. 101-118, 2011. DOI:10.1016/B978-0-12-384927-4.00004-X.

RAMEY, David D.; OUGH, Cornelius S. Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 928-934, 1980. DOI:10.1021/jf60231a021.

RENOUF, Vincent; CLAISSE, Olivier; LONVAUD-FUNEL, Aline. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 149-164, 2007. DOI:10.1007/s00253-006-0798-3.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal. *et al*. **Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2021. 544p.

ROLDÁN, A. *et al*. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 574-582, 2011. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.045.

ROSI, Iolanda; VINELLA, M.; DOMIZIO, Paola. Characterization of β-glicosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 519-527, 1994. DOI:10.1111/J.1365-2672.1994.TB04396.X

ROWE, E. S. Effects of ethanol on membrane lipids. *In:* WATSON, R.R. (Org.), **Alcohol and neurobiology receptors, membranes and channels** . Boca Raton: Ed. CRC Press, 1992. p. 239-268.

SABEL, Andrea *et al*. Wickerhamomyces anomalus AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. **Annals of Microbiology**, v. 64, n.2, p. 483-491, 2014. DOI:10.1007/s13213-013-0678-x.

SAMARGHANDIAN, Saeed; FARKHONDEH, Tahereh; SAMINI, Fariborz. Honey and health: A review of recent clinical research. **Pharmacognosy research**, v. 9, n. 2, p. 121, 2017. doi: 10.4103/0974-8490.204647.

SAMPAIO, J. P. *et al*. Taxonomy, diversity and typing of brewing yeasts. *In*: BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. **Brewing Microbiology Current Research, Omics and Microbial Ecology**. Poole: NA Bokulich. 2017.p. 85. DOI:10.21775/9781910190616.04.

SANCHES, S. M. *et al*. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n.1, p. 53-58, 2003. DOI:10.5380/pes.v13i0.3165.

SANTOS, K. F. R. *et al*. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40, n. 6, p. 493-496, 1999. DOI:10.1006/phrs.1999.0556.

SASAKI, Naoko *et al*. Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. **Chemicobiological interactions,** v. 145, n. 1, p. 101-116, 2003. DOI: 10.1016/s0009-2797(02)00248-x.

SBORGI, S. M. S. **Avaliação da atividade ansiolítica e do possível mecanismo de ação do ácido ferúlico em zebrafish**. 2018. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências biomédicas). UEPG, Ponta Grossa, 2018.

SCHLANDER, Martina *et al*. Purification and properties of yeast proteases secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during growth in a white grape juice. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 2, 2016. **DOI:10.3390/fermentation3010002**.

SCHNEITER, R .; REINER S.; MICOLOD, D. *Saccharomyces cerevisiae,* a model to study sterol uptake and transport in eukaryotes. **Biochemecal Society Transaction**, v.33, n.5, p.1186-1188, 2005. DOI:10.1042/BST0331186.

SCHNIERDA, T. *et al*. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 478-485, 2014. DOI: 10.1111/lam.12217.

SCHULLER, Dorit; CASAL, Margarida. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n.3, p. 292-304, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1994-2.

SEBRAE. **Apicultura: relatório de inteligência**. 2015. Disponível em: <http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/ 803afcf50b5e78c72c250aa49f1960c2/$File/5384.pdf>. Acesso em: 09 mar. 2021.

SERAGLIO, S. K. T. *et al*. An overview of physicochemical characteristics and health promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**, v. 119, p. 44- 66, 2019. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.028.

SHARMA, Neha *et al*. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 3053-3059, 2020.

SHARQUIE, K.E.; NAJIM, R.A. Embalming with honey. **Saudi Medical Journal**, v. 25, n. 11, p. 1755-1766, 2004.

SHEIKH, Dilnawaz *et al*. Studies on the antimicrobial activity of honey. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 51-62, 1995.

SILVA, Mayara Salgado. **Desenvolvimento de fermento para produção de hidromel**. 2017. 122f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

SILVA, P. S.; NAVARRO, F. Efeitos da ingestão de chá verde sobre oxidação lipídica no sedentarismo e no exercício. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 3, p.45-60, 2007.

SILVA, R. A. *et al*. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2008.

SKOOG, Douglas A. *et al*. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª edição. São Paulo: Cengage Learning, 2006. 604p.

SMITH, B. D.; DIVOL, Benoit. Brettanomyces bruxellensis, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. **Food microbiology**, v. 59, p. 161-175, 2016. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.008.

SOCHA, Robert *et al*. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. **Natural Product Research**, v. 29, n. 5, p. 416-422, 2015. DOI: 10.1080/14786419.2014.949705.

SOUCIET, Jean-Luc *et al*. Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae. **Genome research**, v. 19, n. 10, p. 1696-1709, 2009. doi: 10.1101/gr.091546.109.

SOUSA, H. R. **Efeito antitumoral da miricetina associado aos mecanismos de adesão celular em linhagem metastática de câncer de mama**. 2022. 84f. Tese (Doutorado em ciências da saúde). UFMA, Maranhão, 2022.

SOVA, Matej; SASO, Luciano. Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2190, 2020. DOI: 10.3390/nu12082190.

SPAGNA, Giovanni *et al*. Properties of endogenous β-glicosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1030-1035, 2002. DOI:10.1016/S0141-0229(02)00239-9.

SROKA, Paweł; TUSZYŃSKI, Tadeusz. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1250-1257, 2007. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.01.046.

STAMBUK, B. U. *et al*. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 4, p. 370-376, 2006. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01982.x.

STAROWICZ, M.; GRANVOGL, M. Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. **Trends in Food Science & Technology**. v. 106, p. 402-416, 2020. DOI:10.1016/j.tifs.2020.09.006.

STEENSELS, Jan *et al*. Brettanomyces yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 206, p. 24-38, 2015. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005.

STEENSELS, Jan; VERSTREPEN, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual review of microbiology**, v. 68, n.1, p. 61-80, 2014. DOI:10.1146/annurev-micro-091213-113025.

SUARESSIG, Denise. **Apicultura: produção de mel bate recorde no brasil.** Baldoni, 2023. Disponível em: https://baldoni.com.br/2023/01/16/apicultura-producao-de-mel-bate-recorde-no-brasil/. Acesso em: 22 de junho de 2023.

SUGIOKA, M. The Relationship Between UV-VIS Absorption and Structure of Organic Compounds. **UV Talk Letter February**. Shimadzu, v. 2, p. 5-6, 2009

SUIKER, I. M.; WÖSTEN, H. A. B. Spoilage yeasts in beer and beer products. **Current Opinion in Food Science**, v. 44, p. 100815, 2022. DOI:10.1016/j.cofs.2022.100815.

SUN, Nan *et al*. Assessment of chemical constitution and aroma properties of kiwi wines obtained from pure and mixed fermentation with Wickerhamomyces anomalus and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 1, p. 175-184, 2022. DOI:10.1016/j.fochx.2022.100427.

ŠVECOVÁ, Blanka *et al*. Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 80-88, 2015. DOI:10.1016/j.jfca.2014.11.002.

SWANGKEAW, Jutaporn *et al*. Characterization of β-glicosidases from *Hanseniaspora sp*. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n.2, p. 423-430, 2011. DOI:10.1007/s11274-010-0474-8.

SWANGKEAW, Jutaporn *et al*. The characterisation of a novel Pichia anomala β-glicosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. **Annals of microbiology**, v. 59, n.2, p. 335-343, 2009. DOI:10.1007/BF03178336.

SWELLAM, Tarek *et al*. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. **International journal of urology**, v. 10, n. 4, p. 213-219, 2003. DOI: 10.1046/j.0919-8172.2003.00602.x.

SWIEGERS, J. H. *et al*. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of grape and wine research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TATARIDIS, Panagiotis *et al*. Use of non-*Saccharomyces* Torulaspora delbrueckii yeast strains in winemaking and brewing. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, v. 124, p. 415-426, 2013. DOI:10.2298/ZMSPN1324415T.

TOKUOKA, KEIKO *et al*. Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 411-427, 1985.

TRISTEZZA, M. *et al*. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarumin* Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. **Frontiers in Microbiology**., v. 7, n. 237, p. 670, 2016. DOI:10.3389/fmicb.2016.00670.

UGLIANO, Maurizio; HENSCHKE, Paul A. Yeasts and wine flavour. *In:* MORENO-ARRIBAS, M.V., POLO, M.C. (eds). **Wine chemistry and biochemistry**, New York: Springer, 2009.p. 313-392. DOI:10.1007/978-0-387-74118-5_17.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION *et al*. **Agency response letter GRAS notice no. GRN 000341.**

VAN DER KLEI, Ida *et al*. Cytology, cell walls and septa: a summary of yeast cell biology from a phylogenetic perspective. *In*: *In*: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, Teun. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 111-128.

VAN RENSBURG, P.; PRETORIUS, I. S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Vol. 21, n.1, p. 52-73, 2000.

VAQUERO, Cristian *et al*. Biocompatibility in ternary fermentations with Lachancea thermotolerans, other non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to control pH and improve the sensory profile of wines from warm areas. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 656262, 2021. DOI:10.3389/fmicb.2021.656262.

VARELA, Cristian; PIZARRO, Francisco; AGOSIN, Eduardo. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3392-3400, 2004. DOI:10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004.

VEDOVATTO, Elizandro *et al*. EVALUATION OF DIFFERENT STARTERS CULTURES IN THE OBTAITION OF ITALIAN-TYPE SAUSAGE. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, n.2, 2019. DOI:10.1590/1809-6891v20e-47777.

VERMERRIS, Wilfred; NICHOLSON, Ralph. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht**:** Springer Science & Business Media, 2007. https://DOI:10.1007/978-1-4020-5164-7. 276p.

VIDAL, Maria de Fátima. **Desempenho da apicultura nordestina em anos de estiagem**. Caderno Setorial Etene, ano II, n. 11, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/documents/80223/2130269/apicultura_11_2017.pdf/6967e3c e-2381-04a5-f3d1-c00f5989a481>. Acesso em: 13 abr. 2021.

WALKER, Graeme M. Pichia anomala: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n.1, p. 25-34, 2011. DOI:10.1007/s10482-010-9491-8.

WALKER, Graeme M.; STEWART, Graham G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016. DOI:10.3390/beverages2040030.

WANG, Bini *et al*. Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (Ziziphus jujuba Miller) during three edible maturity stages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 56-62, 2016. DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.005.

WANG, Wenhua *et al*. Application of Wickerhamomyces anomalus in simulated solid-state fermentation for Baijiu production: changes of microbial community structure and flavor metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 598758, 2020. DOI=10.3389/fmicb.2020.598758.

WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers Publications, 2010. 300p.

WIECZOREK, Jolanta *et al*. Honey as a source of bioactive compounds. **Polish Journal of Natural Sciences**, v. 29, n. 3, p. 275-285, 2014.

WINTERSTEEN, C. L. *et al*. Effect of Heat Treatment on Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Mead. **JFS C: Food Chemistry and Toxicology Effect**, v. 70, n. 2, p. 119–126, 2005.

WINTERSTEEN, C. L.; ANDRAE, L. M.; ENGESETH, N. J. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. **Journal of food science**, v. 70, n. 2, p. C119-C126, 2005.

YAKOBSON, Chad. Pure culture fermentation characteristics of Brettanomyces yeast species and their use in the brewing industry. **The Brettanomyces Project.** Heriot-Watt University, Institute of Brewing and Distilling, Edinburgh Scotland, 2010.

YAN, Tingxu *et al*. Schisandra chinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. **Psychiatry Research**, v. 243, p. 135-142, 2016. DOI:10.1016/j.psychres.2016.06.037.

YILMAZ, Y., TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 422–433, 2004. DOI:10.1016/j.tifs.2004.04.006.

ZAHRANI, N. A. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 204, p. 112609, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112609.

ZAMORA, Fernando. Biochemistry of alcoholic fermentation *In:* MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. (Org.). **Wine chemistry and biochemistry**. New York: Springer. 2009. p. 3-26. https://DOI:10.1007/978-0-387-74118-5_1

ZHA, Musu *et al*. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with Wickerhamomyces anomalus for Chinese Baijiu making. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 2018. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.010.

ZHANG *et al*. Research Progresso n the Anticarcinogenic Actions and Mechanisms of Ellagic Acid. **Journal Cancer Biology and Medicine**, v 11, n. 2, p. 92-100, 2014. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.004.

ZHAO, J. *et al*. Ferulic acid enhances the vasorelaxant effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory rat aorta. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 807–814, 2014. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.03.013.

ZUZUARREGUI, Aurora; DEL OLMO, Marcel· lí. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 7, p. 699-710, 2004. DOI:10.1016/j.femsyr.2004.01.008.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da capacidade fermentativa de leveduras *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* para a produção de hidromel

Resumo

O hidromel é uma bebida, que remota a mais de 8000 anos, produzida pela fermentação do mel por leveduras. A disponibilidade e utilização de mel de diferentes procedências confere à produção de hidromel um amplo leque de possibilidades, porém as leveduras utilizadas são geralmente as mesmas utilizadas na produção de vinhos e cervejas, o que acaba gerando produtos sem assinatura própria. O objetivo deste estudo foi analisar a capacidade fermentativa de leveduras *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* em mosto de hidromel produzido com mel do Bioma Caatinga dos municípios de Serra Talhada e Triunfo (Pernambuco-Brasil). Treze cepas de leveduras, 7 *Saccharomyces* e 6 *não-Saccharomyces*, foram inoculadas em mosto de mel não suplementado e tiveram seu processo fermentativo monitorado, com coletas a cada 24 horas para análises físico-químicas: concentração de sólidos solúveis, concentração de etanol, pH, açúcares residuais; viabilidade celular e ao final do processo foi realziada análise cromatográfica para detecção de compostos fenólicos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que todas as cepas possuem capacidade fermentativa no mosto proposto, com algumas apresentando potencial para fermentação pura e outras para fermentações sequenciais ou mistas, seja pelo seu perfil fermentativo, sensorial e/ou potencial antioxidante.

.

1. Introdução

A produção de hidromel utiliza culturas *starters*, que são leveduras disponíveis comercialmente, nas formas congeladas ou liofilizadas, e que são selecionadas de acordo com a finalidade de uso. Essas leveduras são responsáveis por metabolizar os açúcares redutores presentes no mel e outros aditivos, dependendo do tipo de hidromel que está sendo produzido, gerando etanol e dióxido de carbono como principais produtos da fermentação (BENITO *et al*., 2016; CHEN *et al*., 2013; IGLESIAS *et al*., 2014;).

As leveduras selecionadas são aquelas cepas induzidas a operar e se reproduzir em condições de estresse, sejam causadas, por exemplo, por alto teor de substrato, temperatura não ideal e teores elevados de metabólito (álcool). Além disso, devem ter uma alta capacidade de converter açúcar em álcool (PEREIRA *et al*., 2009).

As leveduras não são responsáveis apenas pelo teor alcoólico da bebida, mas também são de suma importância nas características organolépticas

apresentadas no hidromel, como aroma e sabor. Essa influência é resultado da interação de produtos gerados no metabolismo secundário do microrganismo (ZHA *et al*., 2018).

No entanto, a *Saccharomyces* nem sempre foi a principal levedura na produção de hidromel, devido à baixa homologia entre o mel e as uvas, ou seja, por não apresentarem estruturas semelhantes. Mas estudos mostraram que a *Saccharomyces* provou ser adequada na produção de hidromel, pois tem excelente tolerância às altas concentrações de açúcar inerentes ao mosto e capacidade de crescer em condições anaeróbias (CHEN e LIU, 2016; IGLESIAS *et al*. 2014). O interesse por *Saccharomyces cerevisiae* data do início do século XX, sendo reconhecida como um sistema paradigma entre os eucariotos unicelulares (SCHNEITER; REINER & MICOLOD, 2005), para Briggs *et al.* (2004) é sem dúvida a mais estudada das leveduras e um dos microrganismos mais explorados em pesquisas.

O estudo da ciência e da indústria sobre *Saccharomyces cerevisiae* resultou em uma grande diversidade genética de cepas comerciais (FAY e BENAVIDES, 2005; PADILLA *et al*., 2018). Tudo isso tem resultado em grande valorização nas indústrias de fermentação, pois traz características de primeiro interesse, como: fermentação rápida e completa dos açúcares fermentescíveis; alta produção e tolerância ao etanol; *bouquet* característico, mas moderado; possibilidade de uso com mono, di e trissacarídeos (DEQUIN, 2001; WALKER e STEWART, 2016). Vale ressaltar que tais características não são exclusividade fenotípica de *Saccharomyces cerevisiae*, estando presente em muitos outros gêneros de leveduras, mas é o conjunto e a cooperação dessas qualidades que a faz receber o título de excelência (STEENSELS e VERSTREPEN, 2014).

Saccharomyces cerevisiae é extremamente comercial e eficiente, principalmente por sua capacidade de aproveitar completamente os açúcares do mosto e produzir um produto homogêneo. No entanto, o produto perde muito do seu conteúdo “único”, do *bouquet* aromático e vintage, em detrimento da eficiência, principalmente quando comparado a bebidas fermentadas por leveduras selvagens (PUERTAS *et al*., 2017).

Uma alternativa a essa padronização é o uso de leveduras *não-Saccharomyces*, pois podem aumentar a complexidade aromática, o que aumenta a qualidade do produto (CHEN *et al*., 2013; LI e SUN, 2019; PUERTAS

et al., 2017;). Porém, apesar de trazerem esse aumento de qualidade e acabarem agregando valor ao produto, essas leveduras apresentam baixa tolerância ao etanol, além de uma capacidade fermentativa reduzida e algumas características organolépticas indesejadas (CIANI *et al*., 2016; PETRUZZI *et al*., 2017), de forma que seja proibida a utilização de quaisquer não-*Saccharomyces* para a fermentação de hidroméis.

No entanto, existem algumas cepas dos gêneros *Candida, Pichia, Kluyveromyces e Torulaspora*, que, apesar de não conseguirem completar o ciclo fermentativo, são potenciais agregadores quando utilizadas com leveduras *Saccharomyces* (TATARIDIS *et al*., 2013, VAQUERO *et al*., 2021).

Nos estudos de literatura que utilizaram leveduras não-*Saccharomyces* para produzir hidromel, poucos materiais de referência são encontrados em bancos de dados como Scielo, Portal de periódicos da CAPES, *Web of science*, *Elsevier* e *Google Scholar* foram consultados, buscando as palavras: “mead”, “*yeast*”, “*brewing*” e “non-*Saccharomyces*”. Obteve-se um total de 1410 resultados potenciais, publicados no período de 2015 a 2022, dos quais foram selecionados um total de dezoito artigos, por meio da leitura de seus títulos e resumos disponíveis, após a leitura e análise do artigo na íntegra, esse número foi reduzido para 8 publicações. O que demonstra a contribuição desta pesquisa sobre a utilização de leveduras não-*Saccharomyces* provenientes da fermentação de hidromel.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de fermentação de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* em mel das cidades: Serra Talhada e Triunfo, ambas localizadas no bioma caatinga, no estado de Pernambuco, Brasil. A análise cinética foi realizada na produção de hidromel, a partir da viabilidade celular, crescimento celular, consumo de substrato, variação de pH, sólidos solúveis e concentração de etanol; perfil sensorial e fenólico.

2. **Material e Métodos**

2.1 *Mel*

Os méis utilizados no estudo foram obtidos de duas cooperativas parceiras deste estudo participantes do projeto de pesquisa BCT-0248-2.12/21 (Edital FACEPE, no bioma caatinga (Brasil), que trabalham com méis multiflorais

da apicultura, localizadas nos municípios de Serra Talhada-Pernambuco/Brasil (7°59'7"S, 38°17'34"W) e Triunfo-Pernambuco/Brasil (7°50'26"S, 38 °6′1″W).

2.2 *Leveduras*

Neste estudo foram analisadas treze leveduras (7 *Saccharomyces* e 6 não-*Saccharomyces*).

As cepas de *Saccharomyces* foram obtidas no comércio eletrônico, as quais são habitualmente utilizadas na fabricação de cerveja e/ou vinho. A escolha das leveduras considerou a descrição da contribuição organoléptica, a tolerância alcoólica e a faixa de temperatura ideal para fermentação (Tabela 1). Para os não-*Saccharomyces*, foram selecionadas 6 (seis) leveduras de diferentes gêneros (Tabela 2). As leveduras não-*Saccharomyces*, com exceção das NS03, NS04, NS05, que foram adquiridas comercialmente, foram cedidas pela Micoteca/CCB (UFPE) para essa pesquisa.

Tabela 1- *Saccharomyces* utilizada para o estudo cinético.

CÓDIGO	NOME	ΔT (°C)	TOLERÂNCIA(%ABV)
S01	Saf-Instant Panificação	25-30	-
S02	Indupropil Ca-11	24-32	11-15
S03	Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus*	10-15	7
S04	Red Star Premier Montrachet	15-30	13
S05	Lallemand Belle Saison – Saison Styles	15-35	14
S06	Diastaticus Renaissance TR313	14-25	16
S07	Lalvin k1v-1116	10-35	18

Tabela 2 - Não-*Saccharomyces* usadas no estudo cinético

CÓDIGO	CEPA	ESPÉCIE
NS01	*URM 3981*	*Wickerhamomyces A1*
NS02	L2-LSOG	*Lachancea thermotolerans*
NS03	Levteck Blend Brasil	*Brettanomyces bruxelensis*
NS04	Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Bélgica	*Brettanomyces bruxelensis*
NS05	*Brettanomyces bruxelensis*	*Brettanomyces bruxelensis*
NS06	*URM 3989*	*Wickerhamomyces A1*

2.3 Pré-inóculo

As leveduras foram replicadas utilizando técnicas de transferência estéril, com subcultivo em meio de cultura YPD em erlenmeyers de 500mL. Após atingir a temperatura ambiente, 28ºC, as leveduras foram inoculadas. Após 36 horas as leveduras (10% v/v) foram transferidas para o meio de cultura celular (90% v/v), composto de mel diluído em água destilada na proporção de 30% (v/v), por 48 horas.

2.4 Fermentação

Trinta por cento do mel com 90º Brix foi solubilizado em 70% de água destilada, com o objetivo de se obter, ao final, um meio de fermentação com 26ºBrix. O mosto foi levado à fervura por um período de 15 minutos. 0,9 L de meio de cultivo foi então transferido para cada um dos tanques de fermentação da bancada laboratorial (1,5 L) desenvolvidos no Laboratório de Bioprocessos (UFPE/Brasil) (Figura 1). Em seguida, inoculado com 10% de meio de propagação. O mosto não recebeu nenhuma suplementação, sofreu qualquer correção ou controle de temperatura e pH, fermentando de acordo com a temperatura do local.

A fermentação foi conduzida até que não houvesse variação significativa na concentração de sólidos solúveis (°Brix) por 48 horas. Durante a fermentação, amostras foram coletadas a cada 24 horas para determinar pH, teor de sólidos solúveis, açúcares redutores e viabilidade celular.

Figura 1 - Tanque de fermentação de bancada (1,5 L) desenvolvido no laboratório de Bioprocessos (UFPE/Brasil).

Fonte: Autores.

2.6 Análises microbiológicas, físico-químicas e cromatográfica

2.6.1 Viabilidade e crescimento celular

Foram determinadas por contagem de leveduras em Câmara de Neubauer espelhada, por microscopia de luz (Nikon Eclipse E200®) (Almonacid *et al.,* 2012). A solução de azul de metileno (0,02% p/v) foi utilizada para identificar células viáveis ou não viáveis, e o percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{(células vivas x 100)}}{\text{células totais}}$$

2.6.2 Açúcar residual

Os açúcares residuais foram quantificados por espectrofotometria com DNS (MILLER, 1959).

2.6.3 Concentração de sólidos solúveis

A concentração de sólidos solúveis foi medida utilizando um refratômetro de bancada (AOAC, 2000) e expressada em °Brix (ABBE-RMT; Bel Engineering).

2.6.4 pH

O pH foi medido utilizando um eletrodo, acoplado a um pHmetro digital (TECNOPON mPA 210ª), previamente calibrado com soluções tampão com pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 2000).

2.6.5 Concentração de etanol

A concentração de etanol foi calculada a partir dos dados obtidos na análise de sólidos solúveis, utilizando o programa de computador Brewer's Friend (CERVEJARIA FALLER, 2021).

2.6.7 Compostos fenólicos

Para identificar os compostos fenólicos foram utilizados dois comprimentos de onda 290nm (ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido siríngico) e 304nm (ácido *p*-cumárico, rutina, miricetina e quercetina) e comparação de tempo de retenção. Para realização da análise foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de absorção molecular UV/Vis e coluna analítica Acclaim® 120 Dionex C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (LIMA *et al*., 2011; PORGALI e BYUKTUNCEL, 2012).

2.7 Análise estatística

As análises foram realizadas em leitura repetida e os resultados expressos em média e desvio padrão. Para avaliar diferenças significativas entre as características físico-químicas dos hidroméis foi aplicada uma análise de variância de um fator (ANOVA) e um teste de Duncan. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5%. A análise foi processada no software Excel para Windows.

3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos e apresentados, são de leveduras que não foram originalmente aplicadas a este ambiente de produção, com mosto de mel, mas sim à produção de cervejas e vinhos, e expressam a capacidade fermentativa dessas leveduras em mosto de hidromel, abrindo assim novas possibilidades para a produção de hidromel com assinaturas próprias. Este projeto faz parte da pesquisa BCT-0248-2.12/21 (Edital FACEPE, no bioma caatinga (Brasil).

Uma das variáveis analisadas é o teor de sólidos solúveis (°Brix) (Tabela 3 e 4), em função ao tempo de fermentação, esta variável foi definida, neste trabalho, para determinar o andamento da fermentação e o momento em que ela deve ser interrompida. As leveduras *Saccharomyces* apresentaram um processo

de fermentação mais curto, 9 dias, enquanto as leveduras não-*Saccharomyces* presentaram uma fermentação mais longa, 15,5 dias com queda atenuada nos teores de açúcar e no grau Brix (Tabela 4), porém, mesmo que a atenuação fosse baixa , o fato de ocorrer essa diminuição nos valores de sólidos solúveis indica que ocorreu o processo de fermentação, pois se refere à transformação dos açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico(CO_2) (RIBERAU-GAYON *et al*., 2021).

O estresse etanoico é tradicionalmente um dos critérios de seleção de leveduras, pois as leveduras para produção de bebidas alcoólicas devem apresentar tolerância ao etanol, devido às altas concentrações atingidas durante a fermentação (PEREIRA, 2013). Ao analisar a concentração de etanol (v/v) no final da fermentação (Tabelas 3,4), verifica-se que variou de 7,61±0,13% a 9,08±0,17% para leveduras *Saccharomyces* e menor que 7% para não-*Saccharomyces*, o que poderia indicar uma baixa tolerância ao etanol, não fosse a alta viabilidade celular (>70 %) apresentada por cada levedura (Tabela 4). Ao analisar a relação entre a concentração de etanol e a viabilidade celular, é possível observar que 3 cepas apresentaram possível intoxicação pelo meio alcoólico, com queda abrupta da viabilidade celular que pode ser percebida após 6 dias na concentração etanoica de 7,58±0,19 % (Saf-Instant (S01)); e 7 dias com concentrações de 7,65±0,09 % e 8,53±0,28 % para Indupropil Ca-11 (S02) e Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus* (S03), respectivamente (Figuras 2A,2C), o que não impede que sejam utilizados na fermentação. Embora as leveduras L2-LSOG (NS02), Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Bélgica (NS04), *Brettanomyces bruxelensis* (NS05) apresentem um padrão que não atende a legislação nacional, por meio da Instrução Normativa n° 64 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que prevê concentração superior a 4 % e inferior a 14 % de etanol a 20º C (BRASIL, 2008), isso não as impede de sendo usado em uma co-inoculação ou fermentações sequenciadas.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da matéria-prima e hidroméis obtidos de cada levedura, após 9 dias de fermentação.

Cepa	SS* (°Brix)	FG	Etanol** (% v/v)	pH	Açúcar residual** (g/L)	Eficiência*** (%)	Viabilidade celular** (%)	cel/mL
Mosto	26,07 ±0,21	1,1106 ±0,0010	-	7,51 ±0,03	213,2±2,4	-	-	-
S01 - Saf-Instant	12,47 ±0,12	1,0503 ±0,0005	7,91 ±0,18[a]	6,10 ±0,06	44,6±0,7	79%	26,35% ±1,29%	$1{,}09 \times 10^6 \pm 0{,}22 \times 10^6$
S02 - Indupropil Ca-11	12,47 ±0,06	1,0503 ±0,0002	7,91 ±0,11[a]	6,17 ±0,09	49,2±2,7[a]	77%	39,48% ±2,09%[a]	$0{,}14 \times 10^6 \pm 0{,}08 \times 10^6$
S03 –L. Diamond (*Saccharomyces cerevisiae pastorianus)*	10,87 ±0,12	1,0436 ±0,0005	8,79 ±0,07	5,98 ±0,11	22,7±1,4	89%	37,12% ±1,42%[a]	$2{,}11 \times 10^6 \pm 0{,}41 \times 10^6$
S04 - Red Star Premier Montrachet	12,40 ±0,35	1,0501 ±0,0015	7,95 ±0,32[a]	5,82 ±0,08	49,4±1,2[a]	77%	54,33% ±1,48%	$2{,}32 \times 10^6 \pm 0{,}48 \times 10^6$
S05 - L. Belle Saison (Saison Styles Diastaticus)	13,00 ±0,00	1,0526 ±0,0000	7,6 1±0,13[a]	5,08 ±0,08	52,9±1,1	75%	68,28% ±1,23%	$5{,}36 \times 10^6 \pm 0{,}55 \times 10^6$
S06 - Renaissance TR313	13,00 ±0,00	1,0526 ±0,0000	7,61 ±0,13[a]	4,87 ±0,06	47,0±2,0[a]	78%	63,24% ±2,72%	$3{,}79 \times 10^6 \pm 1{,}09 \times 10^6$
S07 - Lalvin k1v-1116	10,33 ±0,29	1,0414 ±0,0012	9,08 ±0,17	5,42 ±0,06	22,1±0,5	90%	98,57% ±1,06%	$9{,}19 \times 10^6 \pm 1{,}14 \times 10^6$

Resultados apresentados como médias de leituras em triplicata seguidas de desvio padrão.
* SS – Concentração de Sólidos Solúveis
** Letras iguais nas colunas indicam ausência de diferença significativa ($p < 0{,}05$).
***A eficiência é calculada em função dos açúcares redutores (1-açúcar inicial/açúcar final)

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da matéria-prima e hidroméis obtidos de cada levedura, após 372h (15,5 dias) de fermentação

Cepa	SS* (°Brix)	FG	Etanol** (% v/v)	pH	Açúcar residual** (g/L)	Eficiência ***(%)	Viabilidade celular** (%)	cel/mL
Mosto	26,07±0,21	1,1106±0,0010	-	7,51 ±0,03	213,2±2,4	-	-	-
NS01 - *URM 3981*	14,33±0,58	1,0583±0,0025	6,87±0,42	5,25 ±0,07	78,10±0,7	63%	53,79% ±1,00%	$0,59*10^6±0,25*10^6$
NS02 - L2-LSOG	19,63±0,15	1,0814±0,0007	3,84±0,18	3,61 ±0,07	146,5±3,1	31%	70,10% ±1,03%[b]	$1,14*10^6±0,21*10^6$
NS03 - Levteck Blend Brazil	18,20±0,35	1,0750±0,0015	4,67±0,08	3,81 ±0,11	130,7±1,5	39%	81,50% ±3,66%[a]	$1,98*10^6±0,16*10^6$
Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Belgium	19,93±0,12	1,0827±0,0005	3,66±0,19	3,83 ±0,06	154,7±3,7	27%	91,53% ±0,98%	$2,1*10^6±0,14*10^6$
NS05 - *Brettanomyces bruxelensis*	22,00±0,00	1,0920±0,0000	2,45±0,13	3,87 ±0,08	180,5±2,1	15%	47,38% ±5,19%[a]	$0,33*10^6±0,13*10^6$
NS06 - *URM 3989*	16,87±0,12	1,0692±0,0005	5,44±0,07	3,72 ±0,08	113,2±2,4	47%	72,52% ±3,11%[b]	$1,4*10^6±0,24*10^6$

Resultados apresentados como médias de leituras em triplicata seguidas de desvio padrão.
* SS – Concentração de Sólidos Solúveis
** Letras iguais nas colunas indicam ausência de diferença significativa ($p < 0,05$).
***A eficiência é calculada em função dos açúcares redutores (1-açúcar inicial/açúcar final)

Os valores de pH obtidos no final das fermentações foram inferiores aos do mosto melífero (7,51± 0,03) para todas as estirpes (Tabela 3, 4). Durante o estudo, observou-se que após uma queda inicial, nas primeiras 48h, para todas as 13 leveduras, os valores de pH se mantiveram estáveis, não interferindo no processo de fermentação. Esta redução pode ser causada pelo aumento da concentração de gás carbônico (CO_2) e produção de ácidos orgânicos, que ocorre durante a fase anaeróbia do metabolismo, ou pela baixa capacidade tamponante do mosto de mel (MENDES *et al*., 2010).

A maioria das cepas de *Saccharomyces* não apresentou variação significativa na concentração de açúcares residuais (Tabela 3). Entretanto, as linhagens Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus* (S03) e Lalvin k1v-1116 (S07) apresentaram maior consumo de açúcares, com concentrações finais de 22,7±1,4 e 22,1±0,5 g/L. Já as não-*Saccharomyces* encerraram a fermentação com valores superiores a 113,0±2,4g/L de açúcar residual (Tabela 4), o que caracteriza um hidromel com altíssima doçura. Esses altos valores de açúcares residuais podem ser alterados com o redimensionamento das proporções para produzir o mosto, reduzindo assim a carga inicial de açúcares no meio de fermentação, o que aumentaria o volume do mosto com a mesma quantidade de mel, reduzindo os custos de produção.

As concentrações de açúcares residuais durante a fermentação quando analisadas em paralelo com a viabilidade celular (Figuras 2B e 2C; 3B e 3C) indicam que houve provável inibição nas fermentações, pois indicam valores elevados de açúcares e viabilidade celular ao final da fermentação, o que caracteriza fermentações incompletas. Segundo Sroka e Tuszyński (2007), mostos que contêm maiores concentrações de açúcar podem causar a inibição do processo de fermentação devido à pressão osmótica. Um ponto importante a ser observado em relação à concentração inicial de açúcar é o fato de que *Wickerhamomyces anomalus* pode ser um organismo deteriorante em produtos alimentícios com alto teor de açúcar (LANCIOTTI, 1998; TOKUOKA, 1985).

Figura 2 - Perfil cinético de fermentação das sete cepas de *Saccharomyces* estudadas: (A) análise da concentração de etanol (v/v) em função do tempo. (B) gráfico representando a concentração de açúcar (g/100mL) em função do tempo. (C) viabilidade celular (%) em função do tempo.

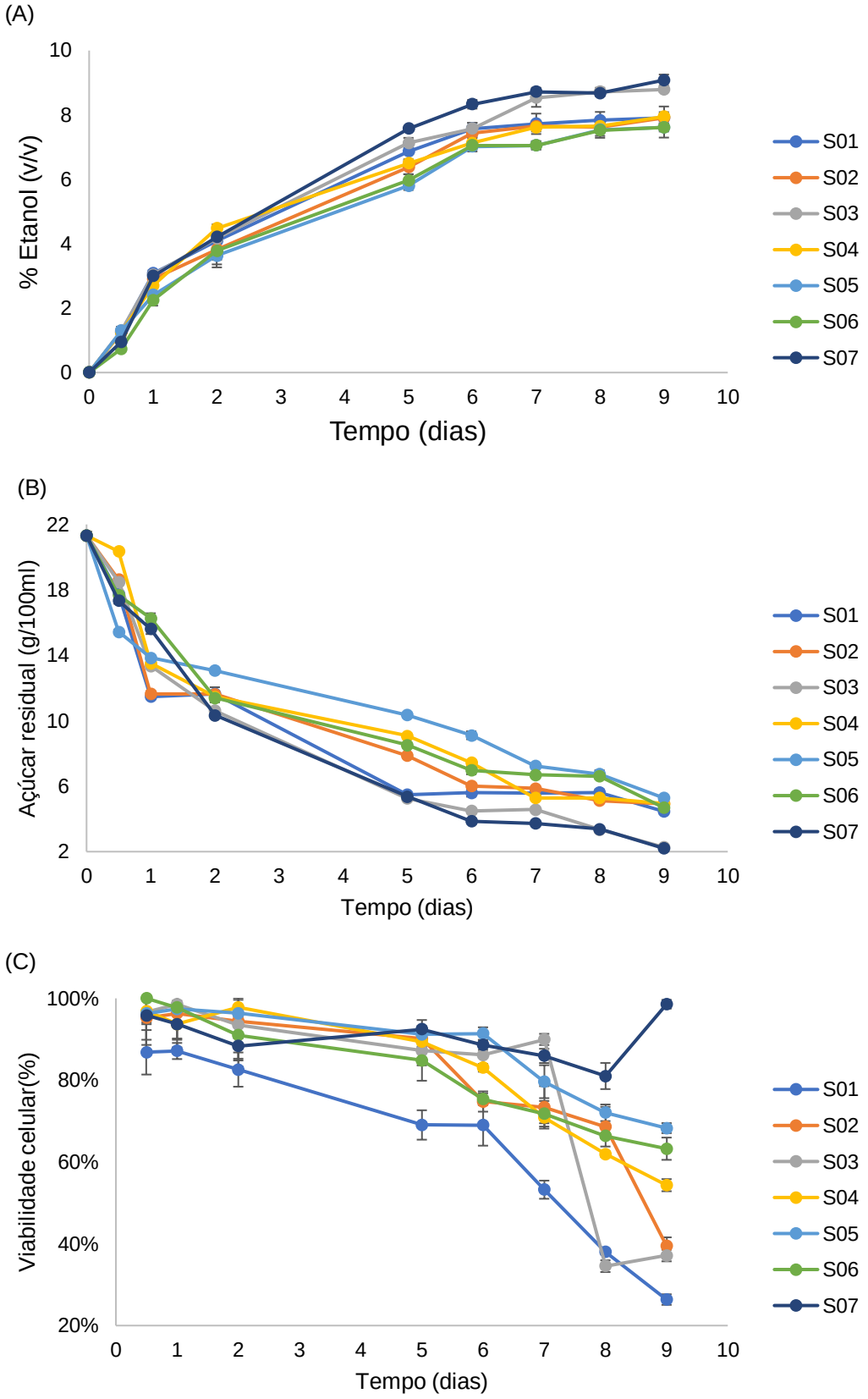
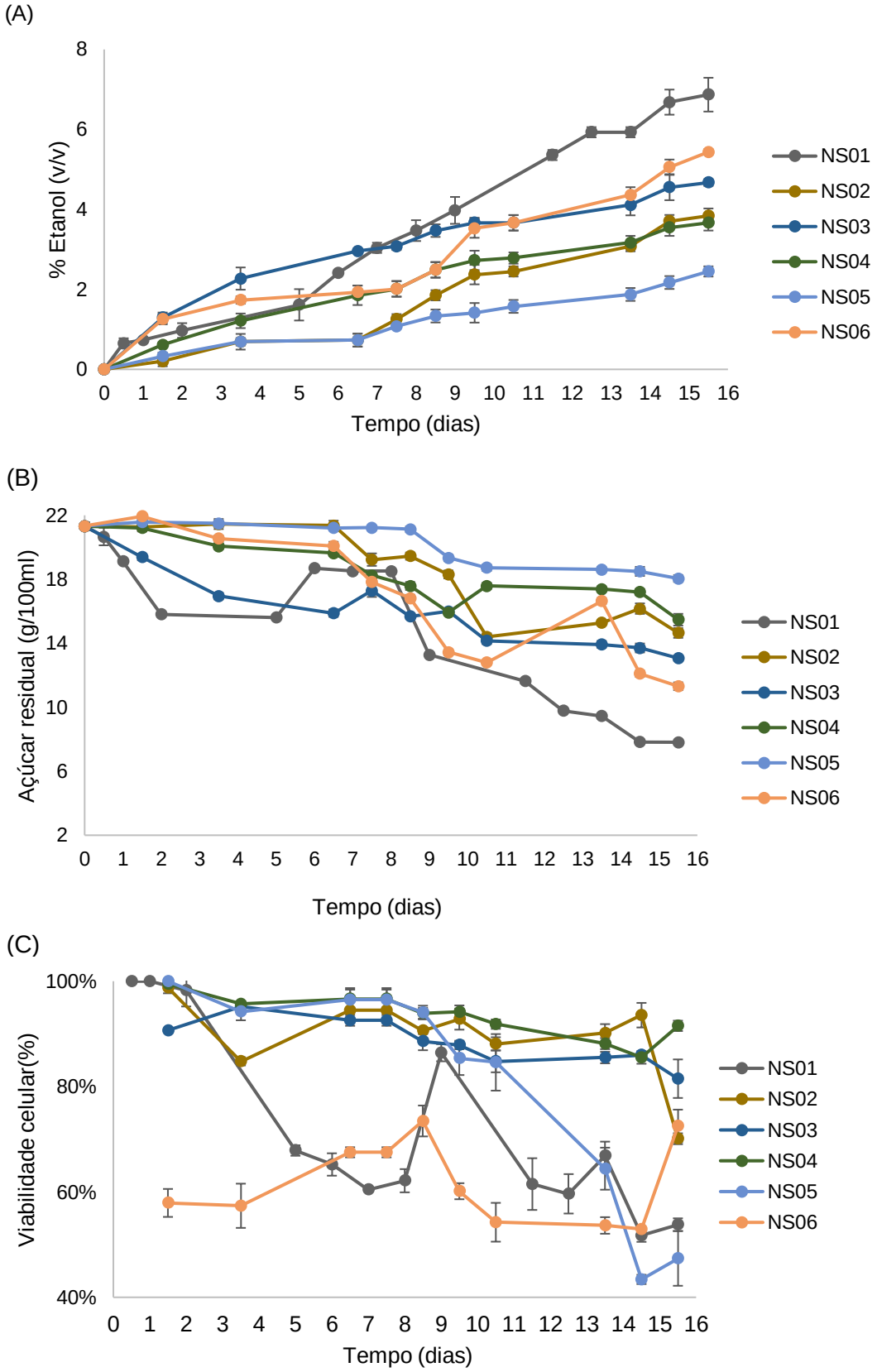


Figura 3: Perfil cinético de fermentação das seis cepas não-*Saccharomyces* estudadas: (A) análise da concentração de etanol (v/v) em função do tempo. (B) gráfico representando a concentração de açúcar (g/100mL) em função do tempo. (C) viabilidade celular (%) em função do tempo.



As cepas de *Saccharomyces* estudadas apresentaram rendimentos acima de 75%, indicando alta capacidade de aproveitamento dos açúcares presentes no mosto. Por outro lado, as não-*Saccharomyces* renderam menos, com a maioria das cepas obtendo rendimento inferior a 50%, o que pode indicar a incapacidade de utilizar açúcares complexos que se encontram em maior concentração no mosto (MORATA *et al*., 2018), ou sofreu inibição devido aos altos níveis de açúcares no mosto. Este parâmetro demonstra a capacidade de aproveitamento dos açúcares presentes no mosto pelas cepas, estando relacionado com a capacidade da levedura em fermentar os açúcares do mosto, e a formação dos compostos de aroma e sabor que compõem a bebida (STAMBUK *et al*., 2006). Essas características foram percebidas em observações feitas pelo grupo de pesquisa, que mostraram que os hidroméis produzidos tinham assinaturas diferentes, abrindo a possibilidade para outras etapas, de otimização, análise sensorial e escalonamento.

A viabilidade celular representa a capacidade de adaptação da levedura ao meio e sua sobrevivência. As leveduras com baixa viabilidade celular Saf-Instant (S01), Indupropil Ca-11 (S02), Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus* (S03), *Brettanomyces bruxelensis* (NS05) (Tabela 3,4) acabam tendo impacto direto na produção de hidromel, pois há uma perda econômica relacionada à aquisição e adaptação da levedura, pois a baixa viabilidade celular torna impossibilitando o reaproveitamento em novas fermentações. A baixa viabilidade celular das cepas Saf-Instant (S01), Indupropil Ca-11 (S02), Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus* (S03) estão relacionadas com o teor alcoólico do mosto (Figura 2A e 2C), porém essa relação não foi encontrada no caso da *Brettanomyces bruxelensis* (NS05), pois a queda da viabilidade celular ocorre em um momento em que a concentração de etanol já estava estabilizada. (Figura 3A e 3C).

De maneira geral, as cepas de *Saccharomyces* apresentaram perfis de viabilidade celular semelhantes, com queda mais acentuada do valor após 6 dias, exceto Renaissance TR313 (S06) e Lalvin k1v-1116 (S07), que apresentaram declínio mais suave (Figura 2C), no caso de cepas de não-*Saccharomyces*, esse comportamento não pode ser padronizado, pois cada cepa apresentou comportamento diferente durante a fermentação. Ao analisar a viabilidade celular em paralelo com os açúcares residuais e concentração de

etanol (Figuras 2B e 2C; 3B e 3C), é possível perceber que a maioria das linhagens apresentou potencial para produção de hidromel, porém a alta concentração de açúcares presentes no mel acabam interferindo no processo de fermentação.

Apesar de todas as 13 cepas estudadas apresentarem capacidade fermentativa, pois conseguiram transformar açúcares fermentáveis em etanol e CO_2, algumas acabaram se destacando, como URM 3981 (NS01) e *Saccharomyces* em geral, com exceção de Saf-Instant (S01), Indupropil Ca-11 (S02) e Lallemand Diamond – *Saccharomyces cerevisiae pastorianus* (S03), que acabaram apresentando uma baixa viabilidade celular no final da fermentação, que teve um bom rendimento, com uma boa viabilidade celular, demonstrando assim potencial a ser explorado em estudos futuros.

Por outro lado, as altas concentrações de açúcares redutores, a boa viabilidade celular final e as baixas concentrações de etanol encontradas nos hidroméis fermentados pelas cepas L2-LSOG (NS02), Levteck Blend Brasil (NS03), Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Bélgica (NS04) e URM 3989 (NS06), abrem a possibilidade de usar essas cepas em um processo de fermentação sequenciado usando um A cepa *Saccharomyces*, como microrganismo sinérgico, pois a combinação: meio com baixa concentração de álcool e quantidade considerável de açúcares fermentáveis, permite que uma segunda cepa continue a fermentação. Porém, ao analisar o pH de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, é possível notar a necessidade de corrigir este parâmetro, para um meio mais ácido, ao inocular a levedura *Saccharomyces*.

Embora este estudo não tenha encontrado uma âncora na literatura consultada sobre fermentações secundárias para hidroméis, ao pesquisar este tópico para vinhos as referências são massivas e promissoras.

Ao passarem por uma análise sensorial não sistemática, na qual os avaliadores foram 4 integrantes do grupo de pesquisa, foi perceptível as características distintas apresentadas em cada um dos 13 hidroméis, dando assim assinaturas únicas às bebidas. Dentre as percepções obtidas as notas frutais e herbáceas foram as mais destacadas, com especial atenção para as notas de uva verde no hidromel fermentado pela Lalvin k1v-1116 (S07) e de banana madura no hidromel fermentado com URM 3981 (NS01).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de origem vegetal, provenientes de diferentes fontes como: frutas, cereais e ervas (MIKOLAJCZAK; TANSKA; OGRODOWSKA, 2021). Nos compostos fenólicos, estão inclusos: flavonoides, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, fitoestrógenos, taninos, estilbenos e curcuminoides (WANG *et al*., 2016). Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes que reduzem ou inibem a propagação das reações de oxidação, capturando a forma reativa do oxigênio (SOCHA *et al*., 2015).

Devido à composição fenólica do hidromel e, consequentemente, sua capacidade antioxidante, estão fortemente relacionados ao mel utilizado, porém a bebida apresenta potencial bioativo benéfico à saúde humana (STAROWICZ; GRANVOGL, 2020). Uma vez que o mel é o principal insumo na produção de hidromel, é ele também o responsável pelo aporte da maior carga fenólica da bebida, isso acontece porque alguns compostos fenólicos são transferidos das plantas para o mel pelas abelhas (KAHOUN; ŘEZKOVÁ; KRÁLOVSKÝ, 2008) e como as características do mel estão diretamente ligadas a condições edafoclimáticas, esse perfil fenólico irá variar de acordo com a origem do mel, da florada, condições climáticas e espécie de abelha que o produziu (SOCHA *et al*. 2015). Apesar dos extensos estudos sobre o perfil fenólico e a atividade antioxidante de diferentes méis (BERGAMO *et al*., 2019; BRUGNEROTTO *et al*., 2019; SERAGLIO *et al*., 2019), quando se trata de hidromel, os estudos ainda são incipientes.

Outro aspecto, não menos importante, a ser considerado quando se trata de compostos fenólicos em bebidas fermentadas é a cepa de levedura utilizada na fermentação, isso se dá, pois, a produção de compostos bioativos está diretamente relacionada ao metabolismo do microrganismo. Em estudo realizado por Guerrini *et al*. (2018) foi percebido que o desenvolvimento de alguns compostos promotores à saúde, além dos compostos fenólicos presentes na própria matriz, é oriundo da cepa utilizada na fermentação alcoólica.

A variação da composição fenólica devido às leveduras (Tabela 5), uma vez que a levedura URM 3989 (NS06) apresenta 6 compostos fenólico (NS6) e a CA-11(S2) apresenta 3 compostos.

Tabela 5 – Perfil fenólico de hidroméis fermentados por diferentes leveduras.

COMPOSTO FENÓLICOS	CEPAS DE LEVEDURAS												
	S01	**S02**	**S03**	**S04**	**S05**	**S06**	**S07**	**NS01**	**NS02**	**NS03**	**NS04**	**NS05**	**NS06**
Ácido Gálico	D	D	D	N/D	D	N/D	D	D	D	D	N/D	D	D
Ácido Vanílico	D	N/D	N/D	D	D	D	N/D	D	D	D	D	D	D
Ácido Siríngico	N/D	N/D	D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	D	N/D	N/D	N/D	N/D
Ácido p-cumárico	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Ácido Elágico	N/D	N/D	N/D	N/D	D	N/D	D	D	N/D	N/D	N/D	N/D	D
Ácido Caféico	D	D	D	N/D	D	N/D	D	N/D	D	D	D	D	D
Ácido Ferúlico	N/D	D	D	D	N/D	D	D	D	N/D	N/D	N/D	N/D	D
Quercetina	N/D	N/D	N/D	D	D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	D	D	N/D
Miricetina	N/D	N/D	D	D	D	D	N/D	N/D	N/D	D	D	D	D
Catequina	D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	D	D	D	N/D	N/D	D
Epicatequina	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Rutina	D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

*D representa que houve detecção do composto, enquanto N/D significa que não houve detecção dele. Leveduras: S01 - Saf-Instant; S02 - Indupropil Ca-11; S03 –L. Diamond (*Saccharomyces cerevisiae pastorianus)*; S04 - Red Star Premier Montrachet; S05 - L. Belle Saison (Saison Styles Diastaticus); S06 - Renaissance TR313; S07 - Lalvin k1v-1116; NS01 - URM 3981; NS02 - L2-LSOG; NS03 - Levteck Blend Brazil; Levteck *Brettanomyces bruxelensis* Belgium; NS05 - *Brettanomyces bruxelensis*; NS06 - URM 3989.

Dentre os compostos identificados, o ácido gálico é o mais presente, com detecção em 10 amostras com diferentes tipos de leveduras. Zahrani, El-Shishtawy e Asiri (2020) relataram que esse composto é encontrado facilmente nas espécies vegetais, e apresenta diferentes atividades biológicas, sendo considerada uma substância, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antinflamatória e antidiabética.

Os ácidos vanílico e cafeico, bem como a catequina, foram detectados, majoritariamente nas leveduras não-*Saccharomyces*. O ácido vanílico atua na regulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (BEZERRA-FILHO *et al*., 2019). Esse ácido e seu metabólito, o vanilil, possuem várias atividades farmacológicas, como no combate à hipersensibilidade diabética e desordens neurológicas, atividade antiasmática e prevenção de câncer de pulmão (SHARMA *et al*., 2020). O ácido cafeico pode atuar na diminuição de incidência de doenças crônicas, por apresentar atividade antioxidante, devido à sua

capacidade de sequestrar radicais livres (LOPES *et al*., 2021), antiproliferativa (SOVA & SASO, 2020), anti-inflamatória e anticancerígena (DING *et al*., 2020). Entretanto, o ácido cafeico possui baixa disponibilidade nos fluídos corporais, mesmo após a ingestão de alimentos que o contém (BIAN *et al*., 2020). As catequinas, possuem sabor amargo e adstringente (NARUKAWA *et al*., 2011) e vêm sendo estudadas principalmente no combate à obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes por meio da redução das frações de triacilglicerol, colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (colesterol LDL). Além disso, também apresentam potencial antioxidante, por meio de suas propriedades quimioprotetoras, que impedem a atividade dos radicais livres no organismo (KONSTANTINIDI & KOUTELIDAKIS, 2019; SILVA & NAVARRO, 2007).

Por outro lado, o ácido ferúlico mostrou-se mais presente nos hidroméis fermentados com as leveduras *Saccharomyces.* Esse composto fenólico apresenta uma vasta gama de propriedades: anti-inflamatório (ZHAO *et al*., 2014), antioxidante (KUMAR; PRUTHI, 2014); e no combate de doenças crônicas como: câncer (LI *et al*., 2012), diabetes (AZAY-MILHAU *et al*., 2013), trombose (HONG *et al*., 2016). Além disso, foram documentados efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral focal, doença de Alzheimer, lesão da medula espinhal e acidente vascular cerebral (HASSANZADEH *et al*., 2016). Aparte desses benefícios o ácido ferúlico vem sendo estudado amplamente pela indústria cosmética como alternativa para o combate aos sinais de envelhecimento e estrias (HAHN *et al*., 2016; MARCATO, 2019), além disso apresenta propriedades antidepressivas e vêm sendo estudado no tratamento de transtornos de ansiedade (SBORGI, 2018).

O ácido elágico foi encontrado em 3 das amostras de *Saccharomyces* e 3 das não-*Saccharomyces*, enquanto o siríngico teve uma detecção em 1 amostra das leveduras *Saccharomyces* e 1 nas não-*Saccharomyces.* A capacidade antioxidante, do ácido elágico, é resultado da associação do anel benzênico a quatro hidroxilas livres ligadas diretamente à estrutura cíclica, o potencial antioxidante está diretamente relacionado a essas, pois são elas que irão reagir com os radicais livres (ABE, 2007; LIMA, 2008; MONTEIRO *et al*., 2005). Estudo realizado em camundongos apontou efeitos antiproliferativos, ou seja, inibe a

invasão de células endoteliais na matriz extracelular humana, e aumenta a atividade antitumoral da mitomicina C. Dessa maneira, nutrientes ricos em ácido elágico ou até mesmo suplementos alimentares podem agir de forma preventiva e como um suporte para a prevenção e tratamento de câncer (CECI *et al*., 2018). Embora o número de estudos *in vivo* ainda seja incipiente, suas descobertas sobre os efeitos do consumo do ácido elágico merecem mais atenção, uma vez que, foi comprovado o papel potencial como terapia adjunta para cânceres de neuroblastoma, ovário, pancreático e astrocitoma (ZHANG *et al*., 2019).

Apesar de poucas amostras detectarem a quercetina 30,77% (S4, S5, NS4, NS5), ela é um flavonol com *status Generally Recognized As Safe* (GRAS) (USFDA) com amplo conhecimento pelos seus potenciais: antiaterogênico, anti-inflamatório (ABBEY & RANKIN, 2011), anticarcinogenico (FRESCO *et al*., 2010) neuroprotetor (SASAKI *et al*., 2003), antibacteriana (CUSHINE & LAMB, 2005), antiviral (GATTO *et al*.,2002) e na preservação de alimentos (JAISINGHANI, 2017). Em contrapartida a miricetina foi detectada em 61,54% dos hidroméis (S3, S4, S5, S6, NS3, NS4, NS5, NS6) e vem sendo estudada pelo seu emprego no combate ao câncer (BAZERGAR,2016), isso se dá pelo seu potencial terapêutico capaz de atuar em relação à inflamação, proliferação celular, apoptose, angiogênese, invasão e metástase (DEVI *et al*., 2015). E recentemente tem sido alvo de estudos promissores como coadjuvante na luta contra com câncer de mama (SOUSA, 2022).

A rutina foi apenas encontrada em 7,69 % das amostras (Saf-Instant (S01)), porém é um flavonoide extremamente relevante pela sua capacidade farmacológica (PEDRIALLI, 2005). Em estudo realizado por Becho, Machado e Guerra (2010) algumas dessas potencialidades foram elencadas, como: melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, promoção e normalização da resistência e permeabilidade da parede vascular; combate à fragilidade capilar; diminuição de perda da acuidade e alterações do campo visual. Além de sua eficiência no tratamento de artrite por *Candida albicans* (HAN, 2009), atividade antihiperlepidêmica (SANTOS *et al*., 1999), anticonvulsivante (NASSIRI-ASL, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008), anticarcinogênica (MACHADO, 2005), efeito anti-inflamatório (GUARDIA *et al*., 2001), supressão da imunidade celular (MIDDLETON, KANDASWAM & THEOHARIDES, 2000).

Ainda que estudos tenham apontado presença massiva dos ácidos p-cumárico e protocatecuico, esses não foram detectados nesse estudo, uma vez que o ácido p-cumárico está diretamente ligado ao tipo de mel utilizado e ao fato de ocorrer suplementação no mosto, enquanto no caso do protocatecuico a detecção não foi possível por não haver padrão para o teste (AKALIN, BAYRAM, & ANLI, 2017; FORTES *et al*., 2022; KAHOUN, ŘEZKOVÁ, & KRÁLOVSKÝ, 2017; STAROWICZ & GRANVOGL, 2020).

4 Conclusão

Neste estudo observou-se que as leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* apresentaram capacidade fermentativa para produção de hidromel. As leveduras não-*Saccharomyces* demostraram capacidade fermentativa diferente entre si, independentemente da espécie. O baixo rendimento fermentativo pode supor que esteja associado a alta concentração de açúcares e a falta de suplementação de base nitrogenada, estudos mais sistemáticos se tornam necessários. No geral, pode-se concluir que leveduras não-*Saccharomyces* demostraram potencial para fermentação pura, enquanto outras poderiam ser estudas em processos heterofermentativo com leveduras *Saccharomyces*, favorecendo assim a continuidade da pesquisa. Em relação aos perfis fenólicos e as percepções sensoriais das leveduras foram variados, destacando a importância da escolha adequada da cepa para produção de hidromel único.

REFERÊNCIAS

ABBEY, E. L.; RANKIN, J. W. Effect of quercetin supplementation on repeated-sprint performance, xanthine oxidase activity, and inflammation. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 21, n. 2, p. 91-96, 2011. doi: 10.1123/ijsnem.21.2.91.

ABE, L. T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AKALIN, Hüsne; BAYRAM, Mustafa; ANLI, R. E. Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 167-174, 2017. **doi:10.1002/jib.396**.

ALMEIDA, Ana Filipa Fernandes de. **Estudo da aplicação de diferentes culturas microbiológicas à produção de cerveja artesanal**. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Universidade do Minho (Portugal), Minho, 2017.

ALMONACID, Sergio F. *et al*. A comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 750-758, 2012. DOI:10.1007/s11947-010-0379-4.

ANDREWS, B. J.; GILLILAND, R. B. Super-attenuation of beer: a study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 58, n. 3, p. 189-196, 1952. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.2050-0416.1952.tb02675.x. Acesso em: 21/maio/2022.

AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of aoac international**. 17th etd., AOAC International, Arlington, 2000.

APONTE, M.; BLAIOTTA, G. Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG. **Frontiers Microbiology**. v.7, p. 809, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00809.

AZAY-MILHAU, J. *et al*. Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (Cichorium intybus L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 755–760, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.046.

BARZEGAR, Abolfazl. Antioxidant activity of polyphenolic myricetin in vitro cell-free and cell-based systems. **Molecular biology research communications**, v. 5, n. 2, p. 87-95, 2016.

BECHO, Juliana Raso Marques; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha De Oliveira. Rutina–estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2009.

BENITO, Á. *et al*. Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of Lachancea thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**. v. 54, n.2, p.135–144, 2016. doi: 10.17113/ftb.54.02.16.4220.

BERGAMO, G. *et al*. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International,** v. 116, p. 745-754, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.09.007.

BEZERRA-FILHO, C. S. M. *et al*. Therapeutic potential of vanillin and its main metabolites to regulate the inflammatory response and oxidative stress. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 19, n. 20, p. 1681-1693, 2019. doi: 10.2174/1389557519666190312164355.

BIAN, Yan *et al*. Natural polyphenols targeting senescence: A novel prevention and therapy strategy for cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 684, 2020. **doi:10.3390/ijms21020684**.

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.

BRIGGS, D.*et al*. **Brewing: science and practice** (Vol. 108). New York: Woodhead Publishing, 2004. 863p.

BRUGNEROTTO, P. *et al*. Características físico-químicas e composição química de mel de melato de bracatinga: uma revisão. *In* OLIVEIRA JÚNIOR, J.M.B, CALVÃO, L. B (Org.). **A arte de criar abelhas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 25-39.

CASELLAS, Gemma Beltran. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism**. 2006. 248f. Tese de Doutorado. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2006.

CECI, Claudia *et al*. Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. **Nutrients**, n. 10, v. 11, p. 1756. 2018. doi: 10.3390/nu10111756

CERVEJARIA FALLER. **Calculadora**. Disponível em:< https://cervejariafaller.com.br/calculadora/>. Acesso em: 20/maio/2022.

CHEN, C. *et al*. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 4, p. 303-308, 2013. **doi:10.1002/jib.95**.

CHEN, Y. *et al*. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0509-4.

CHEYNIER, V. *et al*. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. *In:* ANDERSEN,Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids in wine**. Abingdon: Routledge. 2006.p. 263-318.

CIANCIOSI, D. *et al*. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2322, 2018. doi: 10.3390/molecules23092322.

CIANI, M. *et al*. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 642, 2016. https://DOI:10.3389/fmicb.2016.00642

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.

DEQUIN, Sylvie. The potential of genetic engineering for improving brewing, winemaking and baking yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, p. 577-588, 2001. DOI: 10.1007/s002530100700.

DEVI, K. P. *et al*. Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin. **Life sciences**, v. 142, p. 19-25, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.004.

DING, Sujuan *et al*. The protective effect of polyphenols for colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1407, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.01407.

FAY, Justin C.; BENAVIDES, Joseph A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS genetics**, v. 1, n. 1, p. e5, 2005. doi: 10.1371/journal.pgen.0010005.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 11-22, 2003. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00245-9.

FORTES, J. P. *et al*. Enhancement of the Functional Properties of Mead Aged with Oak (Quercus) Chips at Different Toasting Levels. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 56, 2023. **doi:10.3390/molecules28010056**.

FRESCO, P. *et al*. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 114-134, 2010. DOI: 10.2174/138161210789941856.

GATTO, M. T. *et al*. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 2, p. 269-272, 2002. doi: 10.1016/S0968-0896(01)00275-9.

GOBBI, Mirko *et al*. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. **Food microbiology**, v. 33, n. 2, p. 271-281, 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2012.10.004.

GUARDIA, T. *et al*. Anti-inflamatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, n.9, p. 683-687. DOI: 10.1016/s0014-827x(01)01111-9.

GUERRINI, S. *et al*. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on health-promoting compounds in wine. **Fermentation**. v. 4, n. 2, p. 1-14, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4020026**.

HAHN, H. J. *et al*. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 740–748, 2016. doi: 10.5021/ad.2016.28.6.740.

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by Candida albicans**. International Immunopharmacology,** v. 9, p. 207-211, 2009. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.11.002.

HASSANZADEH, P. *et al*. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. **Life Sciences**, v. 179, p. 9–14, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.08.011.

HATOUM, Rima; LABRIE, Steve; FLISS, Ismail. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 421, 2012. DOI:10.3389/fmicb.2012.00421.

HONG, Q. *et al*. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.01.005.

IGLESIAS, Antonio *et al*. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12577-12590, 2014. DOI: 10.3390/molecules190812577.

JAISINGHANI, R. N. Antibacterial properties of quercetin. **Microbiology research**, v. 8, n. 1, p. 6877, 2017. DOI:10.4081/mr.2017.6877.

JOLLY, N. P.; VARELA, Cristian; PRETORIUS, I. S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 2, p. 215-237, 2014. DOI:10.1111/1567-1364.12111.

KAHOUN, David; ŘEZKOVÁ, Soňa; KRÁLOVSKÝ, Josef. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. **Food chemistry**, v. 219, p. 357-363, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.161.

KAPSOPOULOU, K. *et al*. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 735-739, 2007. DOI:10.1007/s11274-006-9283-5

KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. **Medicines**, v. 6, n.3, p. 94, 2019. DOI: 10.3390/medicines6030094.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 86–93, 2014. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002.

LANCIOTTI, Rosalba *et al*. Hansenula anomala as spoilage agent of cream-filled cakes. **Microbiological research**, v. 153, n. 2, p. 145-148, 1998. DOI: 10.1016/s0944-5013(98)80032-3.

LI, Ruirui; SUN, Yuxia. Effects of honey variety and non-*Saccharomyces cerevisiae* on the flavor volatiles of mead. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 1, p. 40-53, 2019. DOI:10.1080/03610470.2018.1546072.

LI, W. *et al*. Biological activity evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.038.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vivo e in vitro, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi** (*Caryocar brasiliense, Camb*.). 2008. 219f. Tese (Doutorado em Ciência

de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, 2008.

LOPES, Rafaela *et al*. Caffeic acid phenolipids in the protection of cell membranes from oxidative injuries. Interaction with the membrane phospholipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1863, n. 12, p. 183727, 2021. DOI: 10.1016/j.bbamem.2021.183727.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2006. 125f. Dissertacão (Mestrado em bioquímica agrícola) – Programa de Pós-Graduacão em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

MACHADO, P. V. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de dipirona sódica monoidratada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em química). UNIOESTE, Toledo, 2020.

MARCATO, D. C. **Estudo da eficácia in vitro e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética**. 2019. 98f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). UNESP, Araraquara, 2019.

MENDES-FERREIRA, Ana *et al*. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 193-198, 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016.

MENDONÇA, L. R. O; LIBERATO, M. C. T. C. Análise físico-química e biológica dos méis de abelha *Apis melífera L*. de diferentes floradas e produção de hidromel em escala laboratorial. **Produção Acadêmica do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará Volume**, p. 7.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n.4 , p. 673-751, 2000.

MIKOŁAJCZAK, Natalia; TAŃSKA, Małgorzata; OGRODOWSKA, Dorota. Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 110-138, 2021. DOI:10.1016/j.tifs.2021.04.046.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI:10.1021/ac60147a030.

MONTEIRO *et al*. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. DOI:10.1590/S0100-40422005000500029 .

MORAES, L. F. **Guia de Estilos** – BJCP. Pompéia Hidroméis. 2014. Disponível em <https://pompeiahidromeis.com.br/2014/02/19/guia-de-estilos-bjcp/>. Acesso em: 16 jun 2021.

MORATA, Antonio *et al*. Lachancea thermotolerans applications in wine technology. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 53, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4030053**.

NARUKAWA, Masataka *et al*. Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39**. Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 405, n. 4, p. 620–625, 2011.DOI:10,1016/j.bbrc.2011.01.079.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F., Anticonvulsive effects of intracerebroventicular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 989-993, 2008. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2008.01.011.

PADILLA, Beatriz; GIL, J. V.; MANZANARES, Paloma. Challenges of the non-conventional yeast Wickerhamomyces anomalus in winemaking. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 68, 2018. **DOI:10.3390/fermentation4030068**.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, A.P.*et al*. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n. 8, p. 2057-2063, 2009. DOI:10.1016/j.fct.2009.05.028.

PETRUZZI, Leonardo *et al*. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 995, 2017. DOI:10.3389/fmicb.2017.00995.

PUERTAS, B. *et al*. Use of Torulaspora delbrueckii and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 3, p. 733-746, 2017. DOI:10.1111/jam.13375.

RIBÉREAU-GAYON, Pascal. *et al*. **Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2021. 544p.

SABEL, Andrea *et al*. Wickerhamomyces anomalus AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. **Annals of Microbiology**, v. 64, n.2, p. 483-491, 2014. DOI:10.1007/s13213-013-0678-x.

SANTOS, K. F. R. *et al*. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40, n. 6, p. 493-496, 1999. DOI:10.1006/phrs.1999.0556.

SASAKI, Naoko *et al*. Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. **Chemicobiological interactions,** v. 145, n. 1, p. 101-116, 2003. DOI: 10.1016/s0009-2797(02)00248-x.

SBORGI, S. M. S. **Avaliação da atividade ansiolítica e do possível mecanismo de ação do ácido ferúlico em zebrafish**. 2018. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências biomédicas). UEPG, Ponta Grossa, 2018.

SCHNEITER, R .; REINER S.; MICOLOD, D. *Saccharomyces cerevisiae,* a model to study sterol uptake and transport in eukaryotes. **Biochemecal**

Society Transaction, v.33, n.5, p.1186-1188, 2005. DOI:10.1042/BST0331186.

SERAGLIO, S. K. T. *et al*. An overview of physicochemical characteristics and health promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**, v. 119, p. 44- 66, 2019. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.028.

SHARMA, Neha *et al*. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 3053-3059, 2020.

SILVA, P. S.; NAVARRO, F. Efeitos da ingestão de chá verde sobre oxidação lipídica no sedentarismo e no exercício. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 3, p.45-60, 2007.

SOCHA, Robert *et al*. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. **Natural Product Research**, v. 29, n. 5, p. 416-422, 2015. DOI: 10.1080/14786419.2014.949705.

SOUSA, H. R. **Efeito antitumoral da miricetina associado aos mecanismos de adesão celular em linhagem metastática de câncer de mama**. 2022. 84f. Tese (Doutorado em ciências da saúde). UFMA, Maranhão, 2022.

SOVA, Matej; SASO, Luciano. Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2190, 2020. DOI: 10.3390/nu12082190.

SROKA, Paweł; TUSZYŃSKI, Tadeusz. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1250-1257, 2007. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.01.046.

STAMBUK, B. U. *et al*. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 4, p. 370-376, 2006. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01982.x.

STAROWICZ, M.; GRANVOGL, M. Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. **Trends in Food Science & Technology**. v. 106, p. 402-416, 2020. DOI:10.1016/j.tifs.2020.09.006.

STEENSELS, Jan; VERSTREPEN, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual review of microbiology**, v. 68, n.1, p. 61-80, 2014. DOI:10.1146/annurev-micro-091213-113025.

SUN, Nan *et al*. Assessment of chemical constitution and aroma properties of kiwi wines obtained from pure and mixed fermentation with Wickerhamomyces anomalus and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 1, p. 175-184, 2022. DOI:10.1016/j.fochx.2022.100427.

TATARIDIS, Panagiotis *et al*. Use of non-*Saccharomyces* Torulaspora delbrueckii yeast strains in winemaking and brewing. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, v. 124, p. 415-426, 2013. DOI:10.2298/ZMSPN1324415T.

TOKUOKA, KEIKO *et al*. Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 411-427, 1985.

VAQUERO, Cristian *et al*. Biocompatibility in ternary fermentations with Lachancea thermotolerans, other non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to control pH and improve the sensory profile of wines from warm areas. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 656262, 2021. DOI:10.3389/fmicb.2021.656262.

WALKER, Graeme M.; STEWART, Graham G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016. DOI:10.3390/beverages2040030.

WANG, Bini *et al*. Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (Ziziphus jujuba Miller) during three edible maturity stages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 56-62, 2016. DOI:10.1016/j.lwt.2015.10.005.

ZAHRANI, N. A. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 204, p. 112609, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112609.

ZHA, Musu *et al*. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with Wickerhamomyces anomalus for Chinese Baijiu making. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 126, n. 2, p. 189-195, 2018. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.010.

ZHANG *et al*. Research Progresso n the Anticarcinogenic Actions and Mechanisms of Ellagic Acid. **Journal Cancer Biology and Medicine**, v 11, n. 2, p. 92-100, 2014. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.004.

ZHAO, J. *et al*. Ferulic acid enhances the vasorelaxant effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory rat aorta. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 807–814, 2014. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.03.013.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as cepas estudadas todas foram capazes de fermentar em mosto de mel e produzir hidromel. Mesmo as leveduras não-*Saccharomyces* não apresentando um padrão fermentativo, essas cepas despertaram interesse para um estudo a ser desenvolvido futuramente, com foco na otimização das condições fermentativas, bem como em processos heterofermentativos buscando o desenvolvimento de hidroméis únicos.

O perfil fenólico apresentados pelos hidroméis apontou ~~a~~ diferentes capacidades da levedura em moldar esse perfil, uma vez que não foi possível determinar um padrão entre as cepas avaliadas.

De maneira geral, esse estudo aponta a importância da escolha da cepa na produção de hidromel, pois mesmo cepas da mesma espécie, apresentaram perfis fermentativos e fenólicos distintos, o que vai impactar diretamente na produção de um hidromel único.