



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROMÉIS
PRODUZIDOS A PARTIR DE LEVEDURAS SELVAGENS E
SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES ATIVANTES

CYNTHIA BRASIL DA NÓBREGA DE TEIVE E ARGOLLO

Salvador-BA

2020

CYNTHIA BRASIL DA NÓBREGA DE TEIVE E ARGOLLO

**PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROMÉIS
PRODUZIDOS A PARTIR DE LEVEDURAS SELVAGENS E
SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES ATIVANTES**

Orientadora: Dra Aline Telles Biasoto Marques

Coorientadora: Dra Márcia de Fátima Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para
obtenção do título de Mestre.

Salvador-BA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

CYNTHIA BRASIL DA NÓBREGA DE TEIVE E ARGOLLO

PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROMÉIS PRODUZIDOS A PARTIR DE LEVEDURAS SELVAGENS E SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES ATIVANTES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 30 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Aline Camarão Telles Biasoto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA Semiárido
Orientadora

Dr^a. Carolina Oliveira de Souza

Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Mayara Salgado Filho

Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará

“Algumas batalhas são vencidas com espadas e lanças, outras com papel e caneta.”

Tywin Lannister

Dedico este trabalho ao meu marido, pelo apoio incondicional nessa jornada e por dar asas aos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua infinita misericórdia com a qual me conduz, dando-me força e fé diante das incertezas da vida.

Aos meus pais, Everaldo e Telma, pelo amor incondicional e incentivo.

Às minhas irmãs, Martha e Priscila, pela disposição em me ajudar.

Ao meu marido, Daniel, por compreender minha ausência e me motivar na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da UFBA pela oportunidade.

À minha orientadora, Dra. Aline Telles Biasoto Marques, por “apostar” em mim, sendo prestativa e paciente diante de minhas dificuldades. Agradeço a confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Márcia de Fátima Ribeiro, por possibilitar este trabalho e me atender com gentileza e disponibilidade.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Enologia e demais laboratórios, pela disponibilidade e serviço, todos foram essenciais na realização deste trabalho. Meu agradecimento especial à Edna Barros, Luiz Cláudio Corrêa, Renata Torres, Luís Torres, Liliane Félix e Érika Carvalho. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Às minhas amigas mestrandas, Bianca Villas-Boas e Suellen Vieira, pelo grande apoio nessa jornada.

Aos membros da banca examinadora pela participação e contribuição.

Agradeço à todos. Posso dizer que depender das pessoas é danoso, mas poder contar com elas é maravilhoso.

À todos vocês, meu carinho e gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
OBJETIVOS GERAIS.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. HIDROMEL.....	16
1.1. PROCESSAMENTO DO HIDROMEL.....	17
1.2. PROBLEMAS RELACIONADOS À FERMENTAÇÃO.....	20
1.3. ADITIVOS.....	21
1.4.5. PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA HIDROMEL.....	22
2. CADEIA PRODUTIVA DO SETOR APÍCOLA BRASILEIRO.....	23
3. MEL.....	25
4. PÓLEN APÍCOLA.....	29
5. COMPOSTOS FENÓLICOS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	30
6. COMPOSTOS BIOATIVOS EM BEBIDAS.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	33
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE HIDROMÉIS EM FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA COM ADIÇÃO DE PÓLEN APÍCOLA E FOSFATO DE AMÔNIO.....	40
RESUMO.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4. CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CONCLUSÕES GERAIS.....	68
ANEXOS.....	69
ANEXO A – AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO MEL.....	70
ANEXO B – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 280 NM.....	71
ANEXO C – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 320 NM.....	72
ANEXO D – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 360 NM.....	73
ANEXO E – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 320 FLUOR.....	74
ANEXO F – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 280 NM.....	75
ANEXO G – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 320 NM.....	76
ANEXO H – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 360 NM.....	77
ANEXO I – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 320 FLUOR.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Estilos de hidromel classificados pela composição.....	16
Tabela 2. Alguns aditivos utilizados como ativantes na elaboração de hidromel.....	21
Tabela 3. Padrão de identidade e qualidade do hidromel.....	23
Tabela 4. Composição básica do mel.....	25
Tabela 5. Padrão de identidade e qualidade do mel floral.....	26
Tabela 6. Padrão de identidade e qualidade de pólen apícola desidratado.....	30

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição físico-química e avaliação colorimétrica dos diferentes tratamentos de hidromel.....	51
Tabela 2. Compostos fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos individuais ($n=17$) determinados por HPLC-DAD-FD nos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha <i>Apis mellifera</i>	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Fluxograma do processo de elaboração do hidromel.....17
- Figura 2.** Principais classes de compostos fenólicos.....31

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** (A) Mostos em fermentação (fase tumultuosa), (B) Avaliação sensorial dos mostos.....46
- Figura 2.** (A) Amostras H2 e H3 (da esquerda para direita).....54
- Figura 3.** Conteúdo de compostos fenólicos totais dos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha *Apis mellifera* determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (mg EAG L^{-1}).....56
- Figura 4.** Capacidade antioxidante dos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha *Apis mellifera* determinados pelos ensaios *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP (mmol TE L^{-1}).....60
- Figura 5.** (A) Gráfico dos escores das amostras e (B) Gráfico de interação das variáveis obtidos através de análise de componentes principais (ACP) com base na composição fenólica total e por classe, capacidade antioxidante e cor dos hidroméis de abelha *Apis mellifera*.....62

RESUMO

O hidromel é uma bebida alcoólica fermentada que vem ganhando importância econômica devido às propriedades terapêuticas do mel e pela crescente demanda por produtos diferenciados decorrente de consumidores que exigem mais opções. Neste contexto, a produção de hidromel é uma alternativa para a diversificação de gêneros baseados nos produtos apícolas visando o desenvolvimento da cadeia apícola da região nordeste. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de hidroméis produzidos a partir de mel de *Apis mellifera* com adição de pólen apícola e fosfato de amônio em fermentação espontânea. Os mostos foram elaborados em três tratamentos diferenciados: H1 – controle; H2 – controle + pólen (30g L⁻¹); H3 – controle + fosfato de amônio (0,4g L⁻¹). Os hidroméis foram avaliados quanto a composição físico-química: densidade, pH, acidez volátil e total, teor alcoólico e extrato seco, SO₂ total, açúcares redutores, cor (L*, a*, b*, C*, h), compostos fenólicos totais, detecção e quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Os resultados foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey (p≤0,05), além de Análise de Componentes Principais (ACP). Todos os tratamentos mostraram diferença significativa (p≤0,5) na composição físico-química para a maioria das variáveis analisadas, distinguindo-se os tratamentos com adição de pólen dos demais. Entretanto, todos hidroméis atenderam a legislação brasileira e classificaram-se como bebida alcoólica suave, por apresentarem teor de açúcar maior que 3g L⁻¹. Adicionalmente, as bebidas mostraram a existência de uma grande variedade de compostos bioativos, com a detecção de 17 compostos fenólicos, dos quais houve destaque para os flavonóis totais dos tratamentos com adição de pólen que apresentaram alta concentração destes compostos. Por conseguinte, os tratamentos com adição de pólen mostraram maior capacidade antioxidante em todos os ensaios (DPPH, ABTS e FRAP), diferenciando-os dos demais tratamentos conforme a ACP. Como conclusão, a utilização de pólen apícola é, inicialmente, uma alternativa na elaboração de hidromel quanto a incrementação da qualidade do produto, principalmente do ponto de vista funcional. Entretanto, estudos relacionados a cinética da fermentação e avaliação sensorial do produto também devem ser conduzidos objetivando fornecer informações complementares para definição do melhor resultado.

Palavras-chaves: mel, *Apis mellifera*, pólen apícola, compostos bioativos, capacidade antioxidante *in vitro*.

ABSTRACT

Mead is a fermented alcoholic beverage that has been gaining economic value due to the therapeutic properties of honey and the demand for inovative products due to consumers who demand more options. In this context, the production of mead is an alternative for the diversification of goods based on bee products aiming at the development of the bee chain in the northeast of Brazil. Thus, the aim of this study was to evaluate the quality of mead produced from *Apis mellifera* honey with the addition of bee pollen and ammonium phosphate under spontaneous fermentation. The mead worts were set into three different lots: H1 – water + honey; H2 – water + honey + bee pollen (30g L⁻¹); H3 – water + honey + ammonium phosphate (0.4g L⁻¹). Meads were evaluated using physicochemical parameters: specific gravity, pH, volatile and total acidity, alcohol content and dry extract, total SO₂, reducing sugars, color (L*, a*, b*, C*, h), total phenolic content, phenolic profiling and antioxidant capacity. Results were submitted to ANOVA and Tukey's test (p≤0,05), in addition to Principal Component Analysis (PCA). All lots were significant difference (p≤0.5) in physicochemical parameters for most of variables analyzed, distinguishing the lots using pollen addition from the others. However, all meads were in compliance with brazilian legislation and were classified as sweet mead, as it had sugar content greater than 3g L⁻¹. In addition, meads contained a wide variety of bioactive compounds, 17 phenolic compounds were detected, which there was an emphasis on total flavonols of lots using pollen addition that presented high concentration of these compounds. Therefore, lot using pollen addition revealed greater antioxidant capacity in all assays (DPPH, ABTS and FRAP), differentiating it from the other lots according to the PCA. In conclusion, using of pollen is, initially, an alternative to mead elaboration in terms of increasing the product quality, mainly from the funtional point of view. However, studies related to fermentation kinetics and sensory evaluation of the product should also be conducted in order to provide additional information to define the best mead.

Keywords: honey, *Apis mellifera*, bee pollen, bioactive compounds, *in vitro* antioxidant capacity.

INTRODUÇÃO GERAL

O hidromel é uma bebida alcoólica resultante da fermentação alcoólica do mel diluído em água por ação de leveduras (BRASIL, 2012), sendo tradicional nos países eslavos e reconhecida como uma das bebidas mais antigas consumidas pelo homem. O hidromel vem ganhando importância econômica progressivamente, devido às propriedades terapêuticas atribuídas ao mel e pela crescente demanda por produtos *gourmet* decorrente de consumidores que exigem mais opções (MENDES-FERREIRA et al., 2010). O hidromel ainda é pouco conhecido em alguns países, mas tem demonstrado grande potencial comercial, apresentando crescente aumento no número de hidromelarias no exterior (IGLESIAS et al., 2014). Entretanto, no Brasil, existe um mercado incipiente, representado por pouco mais de 20 empresas de hidromel registradas, além dos produtores informais (MACHADO, 2020).

Por outro lado, a apicultura tem se expandido notavelmente no Brasil, tornando-o um grande exportador de mel com alta competitividade no mercado mundial (SOUZA, 2007; VIDAL 2019). Grande parte deste crescimento deve-se a produção nos estados do nordeste, sendo a segunda maior região produtora nacional, onde tem se mostrado de grande importância para a geração de renda no semiárido (KHAN, 2014; IBGE, 2019). Entretanto, são muitas as dificuldades do setor: a cadeia produtiva que ainda não se encontra bem estruturada, a produção que é voltada para a exportação, contando com instabilidade no mercado mundial, além do baixo consumo *per capita* no país, tornando a atividade vulnerável e fazendo-se necessária a busca por estratégias para explorar o mercado interno (KHAN, 2014).

Contudo, o mercado apresenta crescente tendência marcada pelo interesse do consumidor em produtos naturais, onde o uso de aditivos sintéticos é limitado, além de estar ávido por novos produtos (CORBO et al, 2014). Neste contexto, a produção de hidromel torna-se uma alternativa sólida para aumentar a demanda de o mel e demais produtos apícolas no mercado interno, além de promover a manutenção da cadeia apícola na região nordeste e fornecer ao consumidor uma bebida alcoólica inovadora.

Assim, considerando a necessidade do setor apícola de buscar estratégias para explorar o mercado interno e a busca do consumidor por produtos diferenciados, o estudo visou avaliar a qualidade de hidroméis produzidos a partir de mel de *Apis mellifera* com adição de pólen apícola e fosfato de amônio em fermentação espontânea.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade de hidroméis produzidos a partir de mel de *Apis mellifera* com adição de pólen apícola e amônio de fosfato em fermentação espontânea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição físico-química e colorimétrica dos hidroméis elaborados;
- Indicar o teor de compostos fenólicos totais das bebidas alcoólicas;
- Detectar e quantificar os compostos fenólicos presentes dos hidroméis;
- Determinar a capacidade antioxidante dos hidroméis.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HIDROMEL

O hidromel é uma bebida alcoólica que contém entre 4% e 14% (v/v) de etanol, resultante da fermentação alcoólica do mel diluído em água por ação de leveduras (BRASIL, 2012). É uma bebida tradicional nos países eslavos, sendo reconhecida como uma das bebidas mais antigas consumidas pelo homem. Os estilos de hidromel podem ser classificados quanto a proporção de mel e água utilizados, quanto ao teor de açúcar residual e ainda quanto a ingredientes adicionais. Os poloneses classificam os hidroméis pela proporção do volume da mistura de mel e água em: *dwójniak* (hidromel duplo), quando a mistura possui proporção de 1:1; *trójniak* (hidromel triplo), quando a proporção é 1:2; *półtorak* (1:0,5); e *czwórniak* (1:3) (CZABAJ et al, 2017). Usando terminologia semelhante a do vinho, os estilos de hidromel são classificados como seco, meio seco ou doce, de acordo com sua concentração de açúcar na bebida (GUPTA & SHARMA, 2009). Hidroméis que recebem frutas, ervas ou especiarias em sua composição são classificados como na Tabela 1 (BERRY, 2007).

Tabela 1. Estilos de hidromel classificados pela composição.

Estilo	Composição
Mead	Água e mel
Great mead	Água e mel, envelhecido
Melomel	Água e mel com adição de frutas (exceto uva)
Pyment	Água e mel com adição de uva (uvas viníferas)
Cyser	Água e mel com adição de maçã
Metheglin	Água e mel com adição de especiarias
Braggot	Água e mel com adição de malte
Hippocras	Água e mel com adição de pimentas

Fonte: Berry (2007).

Dado que a produção de mel é uma atividade econômica significativa na Europa, o desenvolvimento de produtos derivados do mel parecem ser uma alternativa sólida para fornecer bebidas alcoólicas inovadoras para os consumidores e aumentar o lucro da indústria apícola (PEREIRA et al, 2015). Atualmente, o hidromel vem ganhando importância econômica progressivamente, devido às propriedades terapêuticas atribuídas ao mel e pela crescente demanda por produtos *gourmet* decorrente de consumidores que exigem mais opções (MENDES-FERREIRA et al., 2010). O hidromel é uma bebida que

pode ter elevado valor agregado a depender da qualidade da bebida, sendo capaz de custar \$25 a garrafa de 350ml e \$85 a garrafa de 750ml (BERNOT, 2020).

O hidromel ainda é pouco conhecido em alguns países, mas tem demonstrado grande potencial comercial, a exemplo dos Estados Unidos que vem apresentando crescente aumento no número de hidromelarias (IGLESIAS et al., 2014). Segundo a American Mead Makers Association (2020), o número estabelecimentos comerciais nos EUA aumentou de aproximadamente 60 em 2003 para cerca de 450 em 2020, além de contar com cerca de 50 vinícolas e cervejarias adicionais, cada uma produzindo pelo menos um hidromel em sua linha de produtos, e mais de 200 hidromelarias em fase de planejamento para inauguração nos próximos dois anos. Entretanto, no Brasil, existem um pouco mais de 20 empresas de hidromel registradas, além dos produtores informais (MACHADO, 2020).

1.1. PROCESSAMENTO DO HIDROMEL

A partir da metodologia descrita por Mattietto et al (2006), as etapas básicas para a elaboração do hidromel são representadas na Figura 1, sendo descritas a seguir.

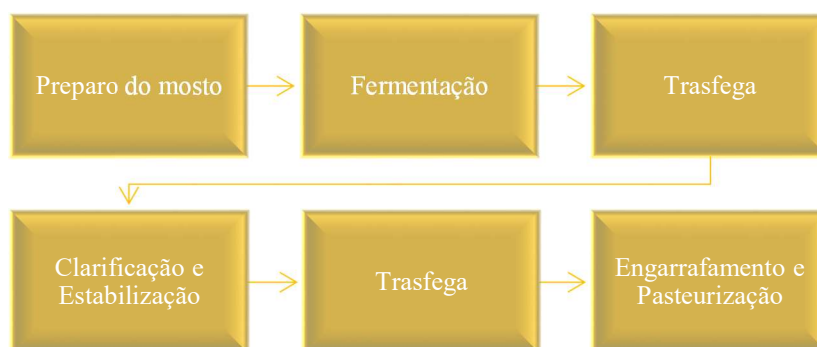


Figura1: Fluxograma do processo de elaboração do hidromel.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O preparo do mosto consiste em, inicialmente, proceder com a diluição do mel em água. Segundo Joshi et al. (1990) para obter um hidromel com teor alcoólico em torno de 12 % (v/v), é necessário a diluir o mel em água fixando-se o teor de sólidos solúveis em 22 °Bx. Para isso, Mattietto et al. (2006), estabelece a aplicação de duas equações (Eq.1 e Eq.2) para a definição das massas de mel e água a serem utilizadas na elaboração do mosto.

$$M_{\text{mel}} \times Bx_{\text{mel}} = M_{\text{mosto}} \times Bx_{\text{Desejado}} \quad (\text{Eq.1})$$

$$M_{\text{água}} = M_{\text{mosto}} - M_{\text{mel}} \quad (\text{Eq.2})$$

Onde:

M_{mel} = massa de mel que será utilizada no processo, a ser obtido do calculado;

Bx_{mel} = °Bx inicial do mel, determinado com auxílio de refratômetro;

M_{mosto} = quantidade pré-estipulada de mosto que se deseja obter;

Bx_{desejado} = valor final estipulado para o °Bx dessa formulação;

M_{mel} = massa de mel determinada pela Eq.1;

M_{mosto} = massa de mosto estipulada na Eq.1;

$M_{\text{água}}$ = massa de água a ser determinada para o mosto.

Após a diluição é recomendado a correção do pH, mantendo-o em um intervalo de 3,7–4,0 para o controle de microrganismos contaminantes e favorecimento do crescimento das leveduras, além de contribuir com o equilíbrio da acidez na bebida (MCCONNELL & SCHRAMM, 1995). Entretanto, alguns autores sugerem pH mais baixo como 3,5 (GOMES, 2010) e 3,6 (ROLDÁN et al, 2011). Os aditivos mais usados são o carbonato de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio e ácido tartárico, além de, às vezes, ácido cítrico ou láctico ser adicionado (GUPTA & SHARMA, 2009).

Em decorrência do mosto de mel ser considerado deficiente em nitrogênio, minerais e outros fatores de crescimento, é indicada a correção nutricional para melhorar o desempenho das leveduras, através de aditivos naturais, como polpas ou sucos de frutas e pólen, ou ativantes de fermentação comerciais, a exemplo de sulfato de amônio e fosfato de potássio (GUPTA & SHARMA, 2009; ROLDÁN et al, 2011). Gomes (2010) sugere a utilização da concentração de 0,85g L⁻¹ a 1g L⁻¹ de ativante comercial, enquanto Roldán et al (2011) sugerem 30g L⁻¹ de pólen.

Subsequentemente, o mosto deve ser pasteurizado para inativar microrganismos indesejáveis e promover a remoção de proteínas através da desnaturação e coagulação, resultando em uma etapa de clarificação mais rápida (MCCONNELL & SCHRAMM, 1995). Entretanto, este método, apesar de ser o mais comum, interfere na qualidade do mosto que tem sua capacidade antioxidante e perfil fenólico alterados (WINTERSTEEN et al., 2005). Atualmente, o método tem sido substituído pela adição de aditivos como o metabissulfito de potássio, sendo recomendado por Gupta e Sharma (2009) a concentração de 50-100 mg L⁻¹ no mosto.

Depois da pasteurização o mosto é inoculado com levedura selecionada. As leveduras usados na produção de hidromel são, geralmente, linhagens de *S. cerevisiae* com características adequadas como para a produção de vinho: atividade fermentativa vigorosa, tolerância ao etanol e dióxido de enxofre, tolerância à variação de temperatura e capacidade de flocular facilmente após conclusão da fermentação. Gomes (2010) sugere a utilização de levedura seca na concentração 0,3 g L⁻¹, enquanto Czabaj et al (2017) indica 0,5g L⁻¹. Entretanto, o hidromel continua a ser produzido em alguns países através de fermentação natural conduzida por microrganismos nativos do mel. Considerando que as leveduras *S. cerevisiae* são os microrganismos dominantes no mosto, Pereira et al. (2009) compararam as habilidades fermentativas de cinco cepas de *S. cerevisiae* isoladas de mel português com uma cepa de vinho comercial, verificando que o desempenho das cepas do mel foram semelhantes a comercial.

A temperatura é um fator relevante, pois interfere na taxa de fermentação e na formação de compostos aromáticos (BRUNELLI, 2015). A fermentação tem sido recomendada a ocorrer em faixas de temperatura como: 10-21°C (MCCONNELL & SCHRAMM, 1995); 18-30°C (GUPTA & SHARMA, 2009); 24-29°C (GOMES, 2010); e 18-20°C (CZABAJ et al, 2017).

Depois de completada a fermentação alcoólica, a trasfega é feita para separar o líquido fermentado dos sólidos que se sedimentam no fundo do recipiente ao término da fermentação por serem fontes de contaminação e por favorecerem reações químicas e bioquímicas que podem originar substâncias promotoras de aroma e sabor impróprios à bebida (MANFROI, 2010). A transferência do líquido para outro recipiente pode ser realizada por sifonação com auxílio de uma bomba de vácuo (MATTIETTO et al, 2006).

Com o mosto transferido para outro recipiente, ele precisa ser maturado para desenvolver suas qualidades gustativas e adquirir limpidez e estabilidade. A clarificação estática consiste na remoção de sólidos suspensos que causam a turbidez na bebida através da adição de clarificantes associados à refrigeração, enquanto a estabilização é uma prática de se apregoa como forma de auxiliar na limpidez, pois na bebida há uma série de sais dissolvidos ou em suspensão que podem vir a cristalizar e comprometer a qualidade do produto. Ao sair da fermentação a bebida pode ser clarificada ao mesmo tempo que sofre estabilização pelo frio. Este processo dura 30 dias e, após esta etapa, nova trasfega é realizada para separar a bebida do sedimento formado (MANFROI, 2010; MATTIETTO et al, 2006). Na clarificação de hidromel, são utilizados frequentemente

como agentes clarificantes a bentonita e a gelatina, porém outros clarificantes como ictocola, clara de ovo e caseína também podem ser usados (MCCONNELL & SCHRAMM, 1995). Roldán et al (2011) sugere o resfriamento a 6°C e a adição de gelatina (0,04g L⁻¹) e bentonita (0,4g L⁻¹).

Após a última trasfega, o hidromel é engarrafado e pasteurizado com o objetivo de cessar a fermentação e aumentar a vida de prateleira da bebida (MATTIETTO et al, 2006; GUPTA & SHARMA, 2009). Entretanto, atualmente, aditivos como sorbato de potássio, são utilizados como conservante, suprimindo o tratamento térmico (PIATZ, 2014). Para este fim, o limite máximo indicado para utilização na bebida é de 0,2g L⁻¹ de sorbato de potássio (BRASIL, 2016).

1.2. PROBLEMAS RELACIONADOS A FERMENTAÇÃO

Devido ao alto teor de açúcar, atrasos na fermentação e produção de aromas indesejados são alguns dos problemas na produção de hidromel associados com a incapacidade das leveduras de se adaptar às condições de stress desfavoráveis ao seu crescimento, causando efeitos negativos na qualidade do produto (PEREIRA, 2009). Alguns dos fatores de stress são as limitações de nutrientes essenciais, o estresse osmótico, o estresse oxidativo, a privação de nitrogênio e a toxicidade ao etanol. Os baixos níveis de substâncias nitrogenadas e de minerais presentes no mel afetam negativamente a evolução do processo multiplicação das leveduras (MCCONNELL & SCHRAMM, 1995).

De todos os nutrientes assimilados pelas leveduras durante a fermentação, os compostos nitrogenados são quantitativamente os mais importantes, depois dos compostos carbonados, pois são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (CASELLAS, 2005). A quantidade de nitrogênio disponível para as leveduras depende das fontes de nitrogênio assimilável presentes no mosto e da concentração de etanol que afeta negativamente a assimilação do nitrogênio, conduzindo a condição de estresse (GOMES, 2010). Um fornecimento inadequado de nitrogênio assimilável no mosto pode levar ao crescimento deficiente da levedura, a fermentações prolongadas, a taxas de crescimento reduzidas e conseqüentemente a um decréscimo da produtividade (PEREIRA, 2015).

A diferença de teores entre glicose e frutose também pode influenciar o processo de fermentação, já que as cepas de *S. cerevisiae* metabolizam preferencialmente a glicose, sendo consumida mais rapidamente, resultando numa predominância de frutose no final da fermentação, havendo dificuldades em fermentar a frutose restante devido as altas concentrações de etanol e escassez de nitrogênio (GOMES, 2010). Este açúcar residual pode induzir refermentação não só por leveduras, mas também por bactérias acéticas e bactérias lácticas, aumentando a acidez volátil e a produção anormal de ésteres, comprometendo qualidade do produto (PEREIRA, 2009).

1.3. ADITIVOS

Os aditivos alimentares são empregados nos alimentos com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação dos mesmos (BRASIL, 1997). Por isto, na elaboração do hidromel são previstos alguns aditivos para estimular a fermentação e melhorar o sabor, além de prevenir e inibir a deterioração da bebida por microrganismos contaminantes. Sais, ácidos, vitaminas são amplamente utilizados na fabricação, como: diamônio fosfato, metabissulfito de potássio, ácido tartárico, biotina entre outros (GUPTA & SHARMA, 2009). De todos os aditivos explorados, os mais importantes que vem a contribuir para o desenvolvimento do hidromel são os compostos nitrogenados que são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (GOMES, 2010). Conforme Iglesias et al (2014), vários aditivos vêm sendo usados para promover a qualidade do produto final (Tabela 2).

Tabela 2. Alguns aditivos utilizados como ativantes na elaboração de hidromel.

País	Aditivos	Fermentação (Dias)	Levedura	Temperatura (°C)
Eslováquia	Sem Aditivo	60-90	<i>Saccharomyces</i>	15-22
Eslováquia	Vitamon Ultra salt®	NI	<i>S. cerevisiae</i> C11-3	25-30
Eslovênia	(NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ , C ₆ H ₈ O ₇ , Vit.B ₁ , NaH ₂ C ₆ H ₅ O ₇ , Vit.B ₇ , Vit.B ₆ , Vit.B ₅ , peptona e myo-inositol	NI	<i>S. bayanus</i> R2 Lalvin	15

Espanha	K ₂ S ₂ O ₅ e pólen	NI	<i>S. cerevisiae</i> ENSIS-LE5®	25
Estados Unidos	Análogo do mel (38% frutose, 30% glicose, 10% maltose e 2% sacarose) diluído em H ₂ O e etanol	28-42	<i>S. cerevisiae</i> LD Carlson	22
Índia	C ₆ H ₁₂ O ₆ , extrato de levedura, peptona, MgSO ₄ , ZnSO ₄ e KH ₂ PO ₄	>90	<i>S. cerevisiae</i>	18–30
Nigéria	H ₂ SO ₃ e SO ₂	21	Fermento seco para panificação	25-26
Polónia	(NH ₄) ₂ HPO ₄ e C ₆ H ₈ O ₇	25-30	<i>S. cerevisiae</i> Johannisberg-Riesling	20-22
Portugal	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	<i>S. cerevisiae</i> QA23 Lalvin e <i>S. cerevisiae</i> ICV D47 Lalvin	25
Portugal	1: Enovit® e C ₄ H ₆ O ₆ ; 2: NH ₄ H ₂ PO ₄ ; KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O; MgSO ₄ ·7H ₂ O, CaSO ₄ , SO ₂ , C ₄ H ₆ O ₆ e bentonita sódica	8–13	<i>S. cerevisiae</i>	27
Portugal	K ₂ C ₄ H ₄ O ₆ , ác.málico e (NH ₄) ₂ HPO ₄	11-14	<i>S. cerevisiae</i> UCD522	25
Portugal	Nutriente comercial e SO ₂	15	<i>S. cerevisiae ph.r.</i> <i>bayanus</i> PB2002	20, 25 e 30
Portugal	K ₂ C ₄ H ₄ O ₆ , ác.málico e (NH ₄) ₂ HPO ₄	NI	<i>S. cerevisiae</i> QA23 Lalvin e <i>S. cerevisiae</i> ICV D47 Lalvin	22

Fonte: Adaptado de Iglesias et al. (2014).

1.4. PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA HIDROMEL

Através do Decreto N°6.871, de 4 de junho de 2009, estabeleceu-se diretrizes relativas a padronização, classificação, registro, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas sob competência do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Neste documento definiu-se hidromel como a bebida com graduação alcoólica de 4 a 14 % em volume, a 20°C, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável (BRASIL, 2009). Posteriormente, o decreto foi complementado, através da Instrução Normativa N°34, de 29 de novembro de 2012, estabelecendo os padrões de identidade e qualidade para

bebidas fermentadas, na qual foram estabelecidos os limites de composição química, bem como a classificação do hidromel, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Padrão de identidade e qualidade do hidromel.

Parâmetro	Limite Mínimo	Limite Máximo	Classificação
Acidez fixa (mEq L ⁻¹)	30	-	-
Acidez total (mEq L ⁻¹)	50	130	-
Acidez volátil (mEq L ⁻¹)	-	20	-
Anidrido sulfuroso total (g L ⁻¹)	-	0,35	-
Cinzas (g L ⁻¹)	1,5	-	-
Cloretos totais (g L ⁻¹)	-	0,5	-
Extrato seco reduzido (g L ⁻¹)	7	-	-
Graduação alcoólica (%)	4	14	-
Teor de açúcar (g L ⁻¹)	-	≤ 3	Seco
	> 3	-	Suave

Fonte: Instrução Normativa N°34 (BRASIL, 2012).

2. CADEIA PRODUTIVA DO SETOR APÍCOLA BRASILEIRO

A apicultura caracteriza-se pela exploração econômica e racional das abelhas *Apis mellifera*, sendo uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos requisitos econômico, social e ecológico, pois fornece renda para o apicultor, ocupa mão-de-obra familiar ou contratada e contribui para a preservação da flora nativa. Dos produtos apícolas, o que tem maior destaque no mercado é o mel, seguido da cera, pólen, própolis, geléia real e apitoxina (PAULA NETO & ALMEIDA NETO, 2006).

A atividade apícola ganhou importância econômica no Brasil a partir de 2001 quando a produção de mel teve um rápido crescimento em virtude do aumento da demanda internacional pelo produto, tornando-se exportador e chegando a ocupar a sexta posição mundial em 2017 (SOUZA, 2007; FAO, 2020). Nesse contexto, a apicultura passou a compor uma cadeia produtiva composta por mais de 300 mil apicultores e uma centena de unidades de processamento de mel que juntos empregam quase 500 mil pessoas (USAID-BRASIL, 2006). Em 2019, a produção nacional de mel atingiu 46 mil toneladas, demonstrando aumento de 8,5% em relação a 2018, o que totalizou R\$ 493,7 milhões no ano (IBGE, 2019). De acordo com os dados do COMEX (2020), o mel foi o 13º produto no *rank* de exportações do setor agropecuário nacional em 2020, tendo

exportado 45.728 mil toneladas. Vale ressaltar que o Brasil é reconhecidamente fornecedor de mel orgânico, tendo sido 91% de todo o mel orgânico importado pelos Estados Unidos em 2018, sendo um dos mais valorizados no mercado americano (VIDAL, 2019). Assim, o mel e demais produtos apícolas vêm gerando a perspectiva de crescimento da participação da apicultura no agronegócio brasileiro (KHAN et al, 2014).

Nos últimos anos, a apicultura tem se expandido notavelmente a partir da produção nos estados do nordeste, cuja taxa de crescimento tem sido superior à do Brasil, e tem se mostrado de grande importância no semiárido na geração de renda, postos de trabalho, conservação e recuperação da vegetação nativa, além de contribuir para o fortalecimento das relações associativas, uma vez que a atividade requer o trabalho comunitário (PAULA NETO & ALMEIDA NETO, 2006). A apicultura desenvolvida no Nordeste tem caráter eminentemente familiar e por ser uma atividade praticada predominantemente por pequenos produtores tem se configurado numa alternativa para diversificação da fonte de renda nas pequenas propriedades rurais (KHAN et al, 2014).

As condições favoráveis de clima e flora do nordeste juntamente com a demanda externa na década de 2000 contribuíram para que a região se tornasse um dos principais polos produtores de mel do país, sendo responsável em 2019 por 34,3% da produção nacional, correspondendo a segunda maior região produtora (VIDAL, 2019; IBGE, 2019). A apicultura nordestina está concentrada no semiárido, com destaque para os estados do Piauí, Bahia e Ceará. Embora a própolis, a geléia real e a apitoxina tenham maior valor agregado, predomina no nordeste brasileiro a produção de mel, com exceção para o Estado de Alagoas, onde os produtores se especializaram na produção de própolis vermelha, e o sul da Bahia que se tornou importante polo produtor de pólen (VIDAL, 2017; IBGE, 2019). O nordeste é uma região, entre poucas do mundo, com capacidade de produção de grande volume de mel livre de resíduos de pesticidas e antibióticos, pois quase toda a produção é proveniente da flora nativa e os enxames são muito resistentes a pragas e doenças, sendo o semiárido a região com maior potencial de produção de mel orgânico no país (VIDAL, 2019).

Apesar das condições favoráveis ao crescimento da produção, existem ainda grandes dificuldades que limitam o desenvolvimento da atividade no país, visto que a cadeia produtiva ainda não se encontra bem estruturada e há falta de integração entre seus componentes. Além disso, o consumo de mel no Brasil é baixo, apesar do mercado interno ser vasto e potencial, pois grande parte da população brasileira percebe o mel apenas

como produto terapêutico e não como alimento (KHAN et al, 2014; NICHELE, 2018). Assim, com a grande aceitação do mel brasileiro no exterior e o baixo consumo no mercado interno, grande parte da produção nacional é destinada à exportação. Entretanto, o Brasil é vulnerável no mercado externo, uma vez que este está centralizado em poucas empresas importadoras, além de grande parte do mel ser exportado a granel com baixo valor agregado. Dessa maneira, se faz necessário buscar estratégias para melhor explorar o mercado interno e fortalecê-lo (KHAN et al, 2014; VIDAL, 2019).

3. MEL

O mel é um produto natural caracterizado como produto viscoso, aromático e açucarado obtido a partir do néctar, substância aquosa secretada pelas flores e/ou exsudados sacarinos, que as abelhas melíferas produzem. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades funcionais estão diretamente relacionadas com a fonte de néctar que o originou, assim como com a espécie de abelha que o produziu (CAMARGO et al, 2002).

A classificação é feita quanto a origem do mel em floral (obtido dos néctares das flores) e ainda subdividido em mel unifloral ou monofloral, quando procede de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, e em mel multifloral ou polifloral quando obtido a partir de diferentes origens florais (BRASIL, 2000).

De acordo com Camargo et al (2002), a composição média do mel, pode ser resumida em três componentes principais: açúcares, água e diversos (Tabela 4). Entretanto, a aparente simplicidade esconde produtos biológicos mais complexos, pois apesar de o mel ser basicamente uma solução saturada de açúcares e água, seus outros componentes aliados às características da fonte floral conferem alto grau de complexidade.

Tabela 4. Composição Básica do mel.

Componente	Composição básica do mel		
	Média	Desvio-padrão	Varição
Água (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26

Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares totais (%)	1,5	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,00 - 13,20
pH	3,91		3,42 - 6,10
Acidez livre (meq/kg)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq/kg)	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq/kg)	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 - 1,028
Nitrogênio (%)	0,041	0,026	0,00 - 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,10 - 61,20

Fonte: Camargo et al. (2002).

A composição do mel é variável e depende da fonte floral do néctar e pólen, do clima, das condições ambientais e sazonais, bem como da manipulação e processamento (ANKLAM, 1998). O mel contém cerca de 200 substâncias (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006), sendo as principais os açúcares e os secundários os minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos (FINOLA et al., 2007), compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), enzimas e outros fitoquímicos (BERTONCELJ et al., 2007). A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais e físico-químicas (AZEREDO et al., 2003), sendo as propriedades físico-químicas avaliadas através de parâmetros estabelecidos em legislação (BRASIL, 2000) como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Padrão de identidade e qualidade do mel floral.

Parâmetro	Mel Floral	
	Limite Mínimo	Limite Máximo
Açúcares Redutores (g 100g ⁻¹)	65	-
Umidade (g 100g ⁻¹)	-	20
Sacarose Aparente (g 100g ⁻¹)	-	6
Sólidos insolúveis em água (g 100g ⁻¹)	-	0,1
Cinzas (g 100g ⁻¹)	-	0,6
Acidez (mEq Kg ⁻¹)	-	50
Atividade diastásica (Göthe g ⁻¹)	8	-
Hidroximetilfurfural (mg Kg ⁻¹)	-	60

Fonte: Adaptado de Brasil (2000).

Os açúcares são os constituintes majoritários do mel, sendo essencialmente frutose (38,4%), glicose (30,3%) e sacarose (1,3%), além de outros açúcares (12%), incluindo dissacarídeos, como maltose e isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos (ANKLAM,1998). Os açúcares redutores, glicose e frutose, são predominantes no mel, sendo a proporção, geralmente, 1,2:1 (frutose:glicose), variando conforme a fonte de néctar (RODRÍGUEZ et al., 2004). Esta proporção pode influenciar tanto no sabor do mel, pois a frutose é mais doce que a glicose, quanto na cristalização, uma vez que a glicose é menos solúvel em água que a frutose. Assim, méis com maior proporção de frutose permanecem líquidos durante mais tempo (FINOLA et al., 2007). Por outro lado, elevado teor de sacarose aparente no mel pode significar uma coleta prematura, já que a sacarose não foi totalmente dissociada em glicose e frutose pela ação da enzima invertase secretada pelas abelhas, além de poder indicar adulteração do mel (SODRÉ et al., 2007).

A água é o segundo componente mais importante do mel. Seu conteúdo depende de vários fatores como época de colheita, grau de maturação alcançado na colmeia e de fatores climáticos (FINOLA et al., 2007). Este parâmetro influencia na viscosidade do mel e contribui para a estabilidade, prevenindo da fermentação e cristalização durante o armazenamento. Entretanto, o conteúdo excessivo apresenta dificuldades na preservação do produto (OLAITAN et al., 2007).

Os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,57% do mel, incluindo predominantemente o ácido glucônico, resultante da ação enzimática na glicose. Fazem parte da composição ainda os ácidos pirúvico, málico, cítrico, succínico e fumárico. Os ácidos orgânicos são os responsáveis pela acidez do mel e contribuem consideravelmente para o seu sabor característico e contra fermentações indesejáveis (ANKLAM, 1998).

Os minerais estão presentes em pequenas quantidades no mel, havendo variação no conteúdo entre os méis claros e méis escuros, sendo normalmente o teor de cinzas mais baixo em méis de cor clara (0,04%) que em méis de cor escura (0,2%) (FINOLA et al., 2007). O potássio é o mineral mais abundante, mas encontram-se outros como cálcio, cobre, ferro, manganês e fósforo (OLAITAN et al., 2007). O conteúdo de minerais do mel pode fornecer indicações acerca da poluição ambiental ou da origem geográfica do mel (ANKLAM, 1998).

O conteúdo de proteínas do mel é, aproximadamente 0,2%, provenientes das abelhas e das plantas, sendo o teor de nitrogênio do mel baixo e variável, apresentando valor médio de 0,04% (ANKLAM, 1998). Os compostos nitrogenados são

essencialmente alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas (AL-MAMARY et al., 2002). Dentre os aminoácidos, a prolina é dominante, mas também há presença de arginina, triptofano e cisteína, cuja presença é característica em alguns tipos de mel (ANKLAM, 1998).

O mel contém, ainda, uma enorme variedade de compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), como constituintes secundários. Os principais flavonóides presentes no mel são miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina (ANKLAM, 1998; BERTONCELJ et al., 2007). Para méis de determinadas origens botânicas é possível determinar padrões de flavonóides característicos, que podem ser usados na determinação da sua origem geográfica (ANKLAM, 1998). Quanto aos ácidos fenólicos, foram identificados como majoritários os ácidos gálico e p-cumárico, e como minoritários os ácidos cafeico, ferúlico, elágico e clorogênico, siríngico, vanílico, cinâmico e p-hidroxibenzoico (BERTONCELJ et al., 2007).

O mel, como quase todos os produtos naturais, possui uma grande diversidade de compostos terapêuticos. As características particulares do mel devem-se a variedade de compostos secundários provenientes do néctar e das abelhas, os quais conferem aroma e sabor específicos, além de atividade biológica (TOSI et al., 2004). O mel contém uma grande variedade de compostos fenólicos e representa uma boa fonte de antioxidantes, o que o torna um bom aditivo alimentar e terapêutico (AL-MAMARY et al., 2002), sendo rico em antioxidantes enzimáticos (glicose-oxidase e catalase) e não-enzimáticos (ácido ascórbico, flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides, ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas) (MEDA et al., 2005). Adicionalmente, a atividade antioxidante do mel tem se mostrado fortemente correlacionada com o teor de compostos fenólicos (BERTONCELJ et al., 2007). O mel também apresenta atividade antimicrobiana, tendo entre as substâncias que contribuem para esta atividade o peróxido de hidrogênio, os ácidos orgânicos, os compostos fenólicos e a lisozima (BASUALDO et al., 2007). Desta forma, o mel apresenta maiores possibilidades de comercialização, pois, além de alimento, também vem sendo explorado em diversas outras indústrias, como a farmacêutica e cosmética, pelas conhecidas ações terapêuticas (FREITAS et al., 2004).

4. PÓLEN APÍCOLA

O pólen é o gameta masculino das flores coletado pelas abelhas e transportado para a colmeia para ser armazenado nos alvéolos e passar por um processo de fermentação. Usado como alimento pelas abelhas na fase larval e abelhas adultas com até 18 dias de idade. É um produto rico em proteínas, lipídios, minerais e vitaminas. Em virtude do seu alto valor nutritivo, é usado como suplementação alimentar, comercializado misturado com o mel, desidratado, em cápsulas ou tabletes (CAMARGO et al, 2002).

As propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais são, geralmente, fixadas para o pólen monofloral, de uma origem botânica particular, uma vez que o pólen multifloral varia nas propriedades. Entretanto, mesmo em fonte semelhante, a composição do pólen pode variar devido a variações sazonais e regionais (MELO et al, 2009). O pólen apícola contém carboidratos (13-55%), proteínas (10-40%), lipídios (1–13%), fibra bruta (0,3–20%) e teor de cinzas (2–6%) (CAMPOS et al., 2008). Além disso, é composto por todos os aminoácidos essenciais e ácidos graxos, aminoácidos livres, vitaminas, principalmente do complexo B, minerais essenciais, carotenóides e compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) (MELO et al., 2016). Pesquisas de caracterização do pólen apícola com base nas propriedades físico-químicas e funcionais aumentaram rapidamente dos últimos 5 anos e atribui-se o fato a grande demanda por produtos naturais e suplementos dietéticos saudáveis (THAKUR & NANDA, 2020)

Devido as propriedades nutricionais e terapêuticas reconhecidas do pólen, a indústria vem procurando sua utilização não apenas como ingrediente nutritivo, mas também como um ingrediente funcional para melhorar as características de qualidade dos produtos. O pólen apícola já foi incorporado em grande variedade de produtos, como: leite fermentado, iogurte, linguiça de porco, produtos de panificação, suco de abacaxi, leite em pó, vinho e hidromel (YERLIKAYA, 2014; GLUŠAC et al, 2015; KRYSTYJAN et al., 2015; CONTE et al., 2018; FLORIO ALMEIDA et al., 2017; ANJOS et al., 2019; ZULUAGA et al., 2016; KARABAGIAS et al., 2018; THAKUR & NANDA, 2019; AMORES-ARROCHA et al, 2018; ROLDÁN et al, 2011). A aplicação de pólen apícola em produtos alimentícios é baseada no potencial de incremento de formulações de produtos processados sobre o valor nutricional, compostos bioativos, tecnofuncionalidades, atributos organolépticos e segurança alimentar (THAKUR &

NANDA, 2020). O pólen apícola foi reconhecido por lei como um aditivo alimentar em países como Argentina, Suíça e Brasil, onde foram oficialmente instituídas normas de padrão de qualidade físico-química, conforme Tabela 6 (ALMEIDA-MURADIANA et al., 2005; BRASIL, 2001).

Tabela 6. Padrão de identidade e qualidade de pólen apícola desidratado.

Parâmetro	Pólen Apícola Desidratado	
	Limite Mínimo	Limite Máximo
Umidade (%)		4
Cinzas (%)		4
Lipídios (%)	1,8	
Proteínas (%)	8	
Açúcares totais (%)	14,5	55
Fibra bruta (%)	2	
Acidez livre (mEq Kg-1)		300
pH	4	6

Fonte: Adaptado de Brasil (2000).

5. COMPOSTOS FENÓLICOS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Os compostos fenólicos são um grupo diverso de metabólitos secundários de plantas, amplamente encontrados em vegetais, frutas e cereais. Nos últimos anos, descobriu-se que as dietas enriquecidas com fenólicos podem ajudar prevenir uma diversidade de doenças crônicas, além do envelhecimento (MARK et al, 2019). O consumo de alimentos é a principal forma de humanos ingerirem compostos fenólicos. Frutas, vegetais e bebidas são todos ricos em fenólicos, especialmente café, chá verde e vinho. Além dos alimentos, os compostos fenólicos estão disponíveis a partir de extração de plantas e síntese química para uso como suplementos e conservantes alimentares (LYU et al, 2017). Os compostos fenólicos possuem atividades biológicas variadas, sendo tipicamente conhecido por sua ação protetora contra os danos causados pelo estresse oxidativo (VIEIRA DA SILVA et al., 2016).

Diferentes fenólicos podem ser categorizados nos seguintes grupos (Fig.2): ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, taninos, ligninas, cumarinas, curcuminóides e quinonas (BASLI, BELKACEM, & AMRANI, 2017). Os ácidos fenólicos são separados em dois grupos: os ácidos benzóicos, que incluem hidroxibenzoatos (C6-C1), e ácidos

hidroxicinâmicos, que possuem hidroxicinamatos (C6-C3) (VIEIRA DA SILVA et al., 2016). Os ácidos hidroxibenzóicos são representados principalmente pelos ácidos gálico e elágico, sendo comumente encontrado em vegetais, enquanto os principais ácidos hidroxicinâmicos são os ácidos cafeico e ferúlico (BASLI, BELKACEM, & AMRANI, 2017). Os ácidos fenólicos podem representar cerca de um terço dos compostos fenólicos da dieta humana, onde essas substâncias têm uma alta atividade antioxidante (VIEIRA DA SILVA et al., 2016).

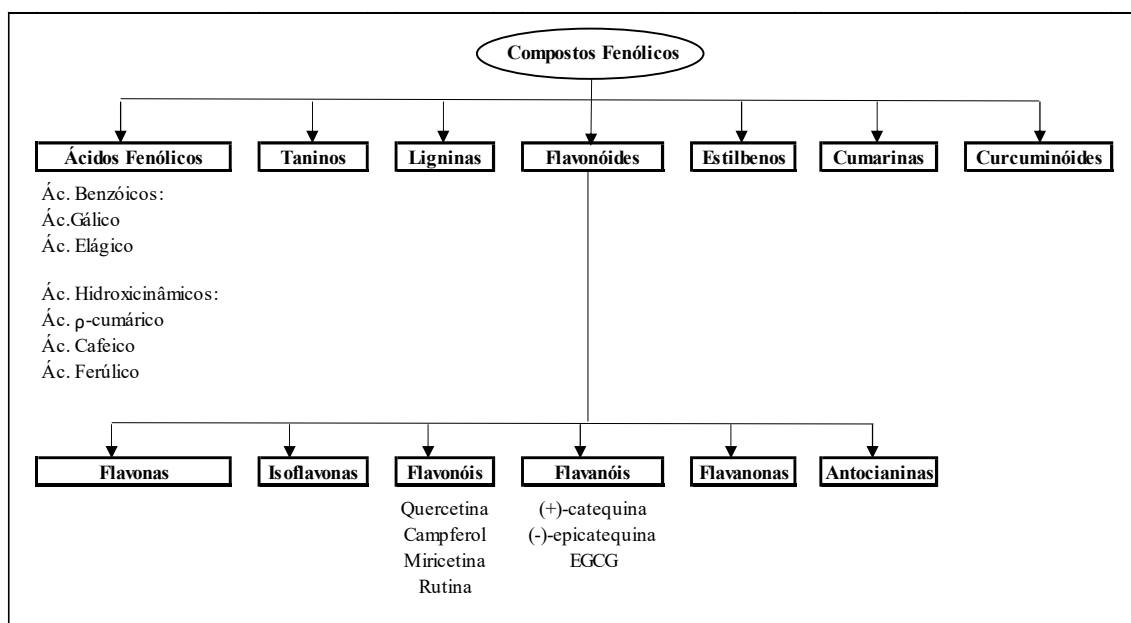


Figura2: Principais classes de compostos fenólicos.
 Fonte: Adaptado de Basli, Belkacem, & Amrani (2017).

Os flavonóides são o grupo mais comum e amplamente distribuído de compostos fenólicos em plantas. Sua estrutura contém dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (VIEIRA DA SILVA et al., 2016). Os flavonóides ocorrem principalmente como agliconas, mas também existem como glicosídeos e derivados metilados (KUMAR & PANDEY, 2013). Eles incluem principalmente flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas e antocianinas (Fig.2). São importantes flavonóis a quercetina, o campferol, a miricetina e a rutina, quercetina-3-O-rutinosídeo, que é o glicosídeo da quercetina. Assim como, são importantes flavanóis a (+)-catequina, (-)-epicatequina e a epigallocatequina-3-galato (EGCG), um derivado da catequina que é éster da epigallocatequina e do ácido gálico (BASLI, BELKACEM, & AMRANI, 2017). Esses compostos têm despertado interesse devido à descoberta de suas

atividades farmacológicas e função reguladora da saúde. Quanto à atividade biológica, foram previamente relatados como tendo efeitos antioxidantes, hepatoprotetores, antibacterianos, antiinflamatórios, anticâncer e antivirais, além de inibir a peroxidação lipídica. Quando adicionados a produtos alimentícios, os flavonóides são responsáveis por prevenir a oxidação de gorduras e proteger vitaminas e enzimas, além de contribuir para a cor e o sabor dos alimentos (KUMAR & PANDEY, 2013).

Os compostos fenólicos têm recebido crescente interesse na saúde humana devido aos seus efeitos benéficos contra várias doenças como o câncer, atribuídos em particular à sua atividade antioxidante (BASLI, BELKACEM, & AMRANI, 2017). Várias investigações apoiam que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na ocorrência de câncer e outros problemas de saúde induzidos pelo excesso de produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) que inclui muitos radicais, como superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), hidroperoxil (OOH^-), peroxil (ROO^-), alcóxil (RO^-), óxido nítrico (NO^-) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). As ERO podem causar danos oxidativos a biomoléculas vitais, como DNA, lipídios e proteínas (ZUJKO & WITKOWSKA, 2011). Os compostos fenólicos podem suprimir a formação de ERO por diferentes mecanismos como a inibição de enzimas tal qual a xantina oxidase e oligoelementos quelantes como íons de ferro livres, envolvidos na formação de radicais e espécies de radicais sequestrantes por doação de hidrogênio. A capacidade antioxidante está relacionada ao número e à posição dos grupos hidroxila no composto fenólico (FANTINI et al, 2015).

6. COMPOSTOS BIOATIVOS EM BEBIDAS

Os compostos bioativos são compostos com propriedades funcionais encontrados nas plantas. Seus efeitos de promoção à saúde foram inicialmente relacionados ao consumo de frutas e vegetais com a redução do risco de desenvolver várias doenças. Por este motivo, a caracterização química de compostos bioativos em alimentos tem sido uma área importante de ênfase na pesquisa nos últimos anos (PAVLOVICH-ABRIL, 2019).

Atualmente, diversos produtos, como alimentos processados e bebidas, compreendem uma nova variedade de alimentos funcionais (OFORI & HSIEH, 2013). Hoje em dia, há inúmeros motivos para incorporar compostos bioativos a bebidas, como:

disponibilidade e possibilidade de satisfazer as necessidades do consumidor; vida de prateleira; e oportunidade ilimitada de combinar nutrientes necessários e compostos bioativos (ASHWANI et al., 2018). Neste contexto, compostos bioativos têm sido propostos como alternativa ao uso de aditivos sintéticos para combater microrganismos contaminantes na indústria do vinho (ORO, 2013).

A crescente tendência marcada pelo interesse do consumidor em produtos naturais, onde o uso de aditivos sintéticos é limitado, é conhecido como “consumismo verde”. Neste sentido, a utilização de ingredientes naturais com forte atividade antioxidante foi sugestionada para criar novas bebidas funcionais a partir da fortificação com polifenóis, tendo em vista que estes ganharam interesse devido ao seu papel benéfico contra doenças crônicas (CORBO et al, 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-MURADIANA, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18, 105–111, 2005.

AL-MAMARY, M., AL-MEERI, A., AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Resaearch**, 22, 1041-1047, 2002.

AMERICAN MEAD MAKERS ASSOCIATION. About AMMA. Colorado, 2020. Disponível em: <https://mead-makers.org/about-amma>. Acesso em: 29 mar. 2021.

AMORES-ARROCHA, A.; ROLDÁN, A.; JIMÉNEZ-CANTIZANO, A.; CARO, I.; PALACIOS, V. Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of Palomino fino and Riesling white young wines. **Food Research International**, 105, 197–209, 2018.

ANJOS, O.; FERNANDES, R.; CARDOSO, S.M.; DELGADO, T.; FARINHA, N.; PAULA, V. Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. **LWT- Food Science and Technology**, 111, 869–875, 2019.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, 63(4), 549–562, 1998.

ARRÁEZ-ROMÁN, D.; GÓMEZ CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA CARRATERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary

electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, 1648-1656, 2006.

AZEREDO, L.C.; AZEREDO, M.A.A.; SOUZA, S.R.; DUTRA, V.M.L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of diferente floral origins. **Food Chemistry**, 80, 249-254, 2003.

BASLI, A., BELKACEM, N., & AMRANI, I. Health benefits of phenolic compounds against cancers. **InTech**, 10, 2017.

BERNOT, K. Breakout Brewer: Superstition Meadery. **Craft Beer & Brewing** [online], Colorado, ago.2020. Disponível em: <https://beerandbrewing.com/breakout-brewer-superstition-meadery/>. Acesso em: 29 mar. 2021.

BERRY, B. **The global mead market: opportunities for canadian mead exporters**. Ottawa, Ontário: Agriculture and Agri-Food Canada, 2007.

BERTONCELJ, J.; DOBERŠEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, 105, 822-828, 2007.

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

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis.

BRASIL. Decreto n.6871 de 4 de junho de 2009. **Regulamenta a lei n.8918 de 14 de junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa n. 34 de 29 de novembro de 2012. **Estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas fermentadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC N° 123, de 4 de novembro de 2016. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2016.

CAMARGO, R.C.R.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R. **Produção de mel**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002.

CASELLAS, G.B. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism**. Tese de Doutorado – Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, 2005.

COMEX. Comércio Exterior. **Comexstat**,2020. Comex Vis. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>>. Acesso em: 6 out 2020.

CONTE, P.; DEL CARO, A.; BALESTRA, F.; PIGA, A.; FADDA, C. Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. **LWT- Food Science and Technology**, 90, 1–7, 2018.

CORBO, M.R.; BEVILACQUA, A.; PETRUZZI, L.; CASANOVA, F.P. & SINIGAGLIA, M. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf**, vol.13, 1192-1206, 2014.

CZABAJ, S.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A.; KLIKS, J. Effects of Mead Wort Heat Treatment on the Mead Fermentation Process and Antioxidant Activity. **Molecules**, 22(5), 803, 2017.

FANTINI, M.; BENVENUTO, M.; MASUELLI, L.; FRAJESE, G.V.; TRESOLDI, I.; MODESTI, A.; BEI, R. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(5):9236–9282, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Faostat**, 2020. New food balances. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em: 6 out 2020.

FINOLA, M.S.; LASAGNO, M.C.; MARIOLI, J.M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, 100, 1649-1653, 2007.

FLORIO ALMEIDA, J.; REIS, A.S.; HELDT, L.F.S.; PEREIRA, D.; BIANCHIN, M.; MOURA, C.; CARPES, S.T. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. **LWT-Food Science and Technology**, 76, 299–305, 2017.

FREITAS, D. G. F., KHAN, A. S., SILVA, L. M. R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. v.42, n.1, p.171-188. 2004.

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

GLUŠAČ, J.R.; STIJEPIĆ, M.J.; MILANOVIĆ, S.D.; ĐURĐEVIĆ-MILOŠEVIĆ, D.M. Physico-chemical properties of honeybee pollen enriched acidophilus milk and probiotic yoghurt. **Acta Periodica Technologica**, 46, 45–54, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v.47, p.1-8, 2019.

IGLESIAS, A.; PASCOAL, A.; CHOUPINA, A.B.; CARVALHO, C.A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Developments in the fermentation process and quality

improvement strategies for mead production. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 12577–12590, 2014.

JOSHI, V.K.; ATTRI, B.L.; GUPTA, J.K.; CHOPRA, S.K. Comparative fermentation behaviour, physico-chemical characteristics and qualities of various fruit-honey wines. **Indian Journal of Horticulture**, New Delhi, v. 47, p. 49-54, 1990.

KARABAGIAS, I.; KARABAGIAS, V.; GATZIAS, I.; RIGANAKOS, K. Bio-functional properties of bee pollen: The case of “bee pollen yoghurt”. **Coatings**, 8, 423, 2018.

KHAN, A.S.; VIDAL, M.F.; LIMA, P.V.P.S.; BRAINER, M.S.C.P. **Perfil da apicultura no nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2014.

KIME, R.W.; MORSE, R.A.; STEINKRAUS, K.H. Mead: history, current technology and prospects. **American Bee Journal**, 138 (2), 121e123, 1998.

KRYSTYJAN, M.; GUMUL, D.; ZIOBRO, R.; KORUS, A. The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. **LWT – Food Science and Technology**, 63, 640–646, 2015.

KUMAR, S.; & PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, 2013.

LYU, X.; NG, K.R.; LEE, J.L.; MARK, R.; & CHEN, W.N. Enhancement of naringenin biosynthesis from tyrosine by metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.**, 2017.

MACHADO, E. Biotecnologia e a Produção de Hidromel. **Profissão Biotec** [online], São Paulo, mar.2020. Disponível em: <https://profissaobiotec.com.br/biotecnologia-producao-hidromel/> Acesso em: 29 mar. 2021.

MANFROI, V. **Vinho Branco**. In: VENTURINI FILHO, W. G (Coord.). *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 7, p143-164.

MARK, R.; LYU, X.; LEE, J.J.L.; PARRA-SALDÍVAR, R.; CHENA, W.N. Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. **Journal of Functional Foods** 57, 233–254, 2019.

MATTIETTO, R.A.; LIMA, F.C.C.; VENTURIERI, G.C.; ARAÚJO, A.A. Tecnologia para obtenção artesanal de Hidromel do tipo doce. Embrapa. **Comunicado Técnico**, 170, p.1-5, 2006.

MCCONNELL, D.S.; SCHRAMM, K.D. Mead success: Ingredients, processes and techniques. **Zymurgy Spring**, 4, 33–39, 1995.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUUMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, 91, 571-577, 2005.

MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A.S; BARTH, O. M. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **LWT-Food Science and Technology**, 65, 808–815, 2016.

MELO, I. L. P.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 68, 346–353, 2009.

MENDES-FERREIRA, A.F.; COSME, A.C.; BARBOSA, A.V.; FALCO, B.A.; INÊS, A.; MENDES-FAIA, A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. **Int. J. Food Microbiol.**, 144, 193–198, 2010.

NICHELE, F. As principais dificuldades à comercialização na apicultura gaúcha. **SEBRAE** [online], set. 2018. Disponível em: <https://sebraers.com.br/apicultura/as-principais-dificuldades-a-comercializacao-na-apicultura-gaucha/>. Acesso em: 06 out 2020.

OLAITAN, P.B.; ADELEKE, O.E.; OLA, I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, 7, 159-165, 2007.

ORO, L. Role of yeast bioactive compounds in food and fermented beverages. PhD Thesis. Polytechnic Univ. of Marche, Faculty of Sciences, Ancona, Italy, 2013.

PAULA NETO, F. L.; ALMEIDA NETO, R. M. **Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006.

PAVLOVICH-ABRIL, A. Bioactive Compounds Incorporated Into Functional Beverages. **Functional and Medicinal Beverages**, vol 11, 109-155, 2019.

PEREIRA, A.P.; MENDES-FERREIRA, A.; ESTEVINHO, L.M.; MENDES-FAIAL, A. Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 405–410, 2015.

PEREIRA, A.P.; DIAS, T.; ANDRADE, J.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L.M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food Chem. Toxicol.** 47, 2057–2063, 2009.

PIATZ, S. **The Complete Guide to Making Mead: The Ingredients, Equipment, Processes, and Recipes for Crafting Honey Wine**. United States of America: Voyageur Press, 2014.

RODRÍGUEZ, G.O.; FERRER, B.S.; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, 84, 499-502, 2004.

ROLDÁN, A.; VAN MUISWINKEL, G.C.J.; LASANTA, C.; PALACIOS, V.; CARO, I. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, 126(2), 574–582, 2011.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; CARVALHO, C.A.L. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciência Rural**, 37 (4), 1139-1144, 2007.

SOUZA, D.C. (Org.). **Apicultura**: manual do agente de desenvolvimento rural. 2ª ed. rev. Brasília: Sebrae, 2007.

TOSI, E.A.; RÉ, E.; LUCERO, H.; BULACIO, L. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. **Lebensm-Wiss.u.-Technol.**, 37, 669-678, 2004.

USAID-BRASIL. United States Agency for International Development. **Análise da indústria do mel**: inserção de micro e pequenas empresas no mercado internacional. Vol 2. [S.I], 2006.

VIDAL, M.F. Desempenho da apicultura nordestina em anos de estiagem. **Caderno Setorial ETENE**, ano 2, n. 11, jul. 2017. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/documents/80223/2130269/apicultura_11_2017.pdf/6967e3ce-2381-04a5-f3d1-c00f5989a481>. Acesso em: 11 out. 2020.

THAKUR, M.; NANDA, V. Process optimization of polyphenol-rich milk powder using bee pollen based on physico-chemical and functional properties. **Journal of Food Process Engineering**, 2019.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 98, 82–106, 2020.

VIDAL, M.F. Evolução da produção de mel na área de atuação do bnb. **Caderno Setorial ETENE**, ano 4, n. 62, jan. 2019. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4570889/62_mel.pdf/ec4632d6-dc5e-6aaa-6b8952b179594ee1#:~:text=2%20Cen%C3%A1rio%20mundial&text=Em%202017%20C%20a%20China%20foi,fornecedor%20para%20a%20Uni%C3%A3o%20Europeia>. Acesso em: 11 out. 2020.

VIEIRA DA SILVA, B., BARREIRA, J.C.M., BEATRIZ, M., OLIVEIRA, P.P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: extraction, biochemistry and protected-delivery technologies: review. **Trends Food Sci. Technol.** 50, 144–158, 2016.

WINTERSTEEN, C.L.; ANDRAE, L.M.; ENGESETH, N.J. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead, **J. Food Sci.** 70(2), 119–126, 2005.

YERLIKAYA, O. Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. **Mljekarstvo**, 64, 268–279, 2014.

ZUJKO, M.E.; WITKOWSKA, A.M. Antioxidant potential and polyphenol content of selected food. **International Journal of Food Properties**, 14(2):300–308, 2011.

ZULUAGA, C.; MARTÍNEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-BALDÓ, J.; QUILES, A.; RODRIGO, D. Effect of high pressure processing on carotenoid and phenolic compounds, antioxidant capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 37, 10–17, 2016.

**CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE HIDROMÉIS EM FERMENTAÇÃO
ESPONTÂNEA COM ADIÇÃO DE PÓLEN APÍCOLA E FOSFATO DE
AMÔNIO**

Desenvolvimento de Hidroméis em Fermentação Espontânea com Adição de Pólen Apícola e Fosfato de Amônio

Cynthia Brasil da Nóbrega de Teive e Argollo^a, Edna Santos de Barros^b, Renata Torres dos Santos e Santos^b, Luís Henrique Pereira de Sá Torres^b, Márcia de Fátima Ribeiro^b, Aline Camarão Telles Biasoto^{b*}

^aDepartamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, 40.170-115, Salvador, BA, Brasil. Tel: +55 (71) 3283-6920.

^bEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, Rodovia BR-428, Km 152, Zona Rural, 56302-970, Petrolina, PE, Brasil. Tel: +55 (87) 3866-3776.

**Autor correspondente. Endereço de E-mail: aline.biasoto@embrapa.br*

RESUMO

O estudo avaliou a influência da adição do pólen de abelha sobre o perfil de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em hidroméis originados de fermentação espontânea. Três diferentes tratamentos foram conduzidos em fermentação espontânea conforme a composição: H1 – controle; H2 – controle + polén apícola (30g L⁻¹); H3 – controle + fosfato de amônio (0,4 g L⁻¹). A determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu*, enquanto o perfil fenólico foi definido através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD-FD). A capacidade antioxidante foi estabelecida pelos ensaios DPPH, ABTS e FRAP. O teor de compostos fenólicos totais variou entre 231,33 a 751,829 mg EAG L⁻¹ (p≤0,05). Foram identificados dezessete compostos entre ácidos fenólicos, flavonóis e flavanóis. A atividade antioxidante das amostras foram consistentes com os resultados do conteúdo de fenólicos totais. De acordo com a análise de componentes

principais (ACP), as amostras de hidroméis diferenciaram-se em função da adição de pólen apícola, indicando forte correlação entre compostos fenólicos, capacidade antioxidante nos ensaios adotados e cor. Os resultados deste estudo demonstram que o emprego do pólen apícola como aditivo teve impacto significativo sobre o conteúdo fenólicos e capacidade antioxidante contribuindo para a qualidade do hidromel.

Palavras-chave: mel, *Apis mellifera*, atividade antioxidante *in vitro*, compostos bioativos, HPLC-DAD-FD.

ABSTRACT

The study evaluated the influence of the addition of bee pollen on the profile of phenolic compounds and antioxidant capacity in meads produced under spontaneous fermentation. Three different mead wort were carried out under spontaneous fermentation according to the composition: H1 – water + honey; H2 – water + honey + bee pollen (30g L⁻¹); H3 - water + honey + ammonium phosphate (0.4 g L⁻¹). The determination of the total phenolic content was measured by the *Folin-Ciocalteu* reagent method, while the phenolic profile was defined by high-performance liquid chromatography–diode array detector method (HPLC-DAD-FD). The antioxidant capacity was established by the DPPH, ABTS and FRAP assays. The content of total phenolic compounds varied widely, ranging from 231,33 and 751,829 mg GAE L⁻¹ (p≤0,05). Seventeen compounds were identified among phenolic acids, flavonols and flavanols. The samples antioxidant activity values were consistent with the results of the total phenolic content. According to the principal component analysis (ACP), the mead samples differed due to according to the addition of bee pollen, indicating a strong correlation between phenolic compounds, antioxidant capacity assays applied and color. The results of this study demonstrate that the use of bee pollen as an additive had a significant impact on phenolic content and antioxidant capacity contributing to the quality of mead.

Keywords: honey, *Apis mellifera*, *in vitro* antioxidant capacity, bioactive compounds, HPLC-DAD-FD.

1. Introdução

O Hidromel, também conhecido como “vinho” de mel, é uma das bebidas alcoólicas mais antigas da humanidade, sendo resultado da fermentação alcoólica do mel diluído em água e contendo de 8 a 18% de etanol (ROLDÁN et al, 2011; LI & SUN, 2019). Diferentes estilos de hidromel são obtidos dependendo da proporção de mel e água utilizados na produção como também pela adição de frutas, ervas e especiarias (KAWA-RYGIELSKAA et al, 2019; SOCHA et al, 2015).

Atualmente, a produção de hidromel vem sendo vista na Europa como uma alternativa para novos produtos à base de mel, com o intuito de aumentar a rentabilidade da apicultura (PEREIRA et al, 2015). Por outro lado, os consumidores são cada vez mais exigentes, insaciáveis por novidades e demandam ao mercado ampliar as opções de produtos inovadores. Assim, o grande potencial da produção de hidromel é evidente em alguns países, como nos Estados Unidos (IGLESIAS et al., 2014). Adicionalmente, o hidromel ganhou progressivamente importância econômica mundial, devido às propriedades funcionais atribuídas ao mel (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

Hoje em dia, diversos produtos, como alimentos processados e bebidas, compreendem uma nova variedade de alimentos funcionais (OFORI & HSIEH, 2013). Há uma crescente tendência marcada pelo interesse do consumidor em produtos naturais, onde o uso de aditivos sintéticos é limitado. Neste sentido, a utilização de ingredientes naturais com forte atividade antioxidante é sugestionada para criar novas bebidas a partir da fortificação com polifenóis, tendo em vista que estes ganharam interesse devido ao seu papel benéfico contra doenças crônicas (CORBO et al, 2014).

A qualidade do hidromel pode ser avaliada através da análise de diversos parâmetros, dentre eles: teores de açúcares redutores, hidroximetilfurfural, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (SVECOVÁ et al, 2015). O perfil de compostos fenólicos do hidromel depende da origem do mel, sendo fortemente influenciado pela adição de sucos de frutas e extratos de ervas, e por etapas do processamento, como fermentação, tratamento térmico e estocagem. Os compostos fenólicos afetam a qualidade sensorial e desempenham um papel significativo na maturação da bebida, pois agem como conservantes naturais, além de apresentarem outras atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e efeitos preventivos contra o câncer (KAHOUN et al, 2008). Neste sentido o conhecimento sobre o conteúdo e a composição

de compostos fenólicos é de extrema importância para o gerenciamento e controle da qualidade do hidromel, possibilitando prever propriedades sensoriais e tempo de estabilidade oxidativa do produto (LUKIĆ et al, 2019).

Apesar de estudos terem sido feitos abordando a avaliação da composição fenólica e atividade antioxidante de hidroméis elaborados a partir da utilização de diferentes tipos de meles, leveduras, processos tecnológicos e aditivos, entre compostos nitrogenados, frutas, ervas e especiarias (SVECOVÁ et al., 2015; AKALIN et al, 2016; CZABAJ et al., 2017; KAHOUN et al., 2008; KAWA-RYGIELSKA et al., 2019; WINTERSTEEN et al, 2005; SOCHA et al, 2015), não foi encontrado nenhum trabalho que descrevesse a influência da adição de pólen sobre o conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em hidroméis. O pólen de abelha é rico em carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, sendo fonte de diferentes carboidratos, além de conter vários aminoácidos essenciais, ácidos graxos, esteróis, carotenóides e polifenóis (AMORES-ARROCHA et al., 2018). Devido às suas qualidades nutricionais e características físico-químicas, o uso do pólen foi proposto em trabalhos anteriores como nutriente para as leveduras e ativante da fermentação alcoólica em hidromel e vinho, sendo verificado sua atuação no processo fermentativo, nas características físico-químicas e sensoriais das bebidas (ROLDÁN et al., 2011; AMORES-ARROCHA et al., 2018). Deste modo, foi observada a necessidade do desenvolvimento de pesquisa visando avaliar a influência do pólen em relação ao conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de hidroméis.

Assim, considerando a crescente demanda por produtos com menos utilização de aditivos sintéticos associados ao importante papel dos compostos fenólicos para a qualidade da bebida, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de hidroméis produzidos com adição de pólen apícola e amônio de fosfato em fermentação espontânea.

2. Material e Métodos

2.1. Matéria-prima e insumos utilizados na elaboração do hidromel

O mel utilizado foi produzido por apicultor da região do Vale do São Francisco (09°04'16,4"S, 0 40°19'5,37"O, Petrolina, Pernambuco, Brasil), oriundo de abelhas *Apis*

mellifera e comercializado em frascos de 1L. O pólen apícola desidratado utilizado foi da marca Alimentos Terra Viva (São Paulo, Brasil), adquirido de loja de produtos naturais em embalagem de 1Kg. A água mineral natural foi retirada em distribuidor da marca Indaiá (Pernambuco, Brasil) em galões de 5L. A levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (Maurivin PDM[®]) foi comprada da Amazon[®] (Rio Grande do Sul, Brasil), assim como o ativante de fermentação fosfato de amônio (Gesferm Plus[®]) e o metabissulfito de potássio. O ácido tartárico e láctico utilizados foram da marca Synth[®] (São Paulo, Brasil), enquanto os clarificantes, sílica coloidal (Eversol[®]) e gelatina líquida (Collagel[®]), foram da marca Ever (Rio Grande do Sul, Brasil). A qualidade do mel foi avaliada conforme laudo analítico no Anexo A.

2.2. Solventes, reagentes e padrões analíticos

Os reagentes químicos *Folin-Ciocalteu*, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)), TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) e ácido orto-fosfórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brasil), enquanto o cloreto de ferro (III) foi adquirido da Êxodo Científica[®] (São Paulo, Brasil), e acetonitrila e metanol (ambos grau HPLC) foram comprados da J.T.Backer[®] (Nova Jersey, EUA).

Os padrões de ácido gálico, cafeico e quercetina diidratada foram obtidos da Chem Service[®] (Pensilvânia, EUA), os padrões dos ácidos caftárico, clorogênico, ferúlico e *p*-cumárico foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Missouri, EUA) e os demais padrões: caempferol-3-O-glucosídeo, isorhamnetina-3-O-glucosídeo, rutina, miricetina, quercetina-3- β -D-glucosídeo, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-galato epicatequina, (-)-galato epigalocatequina, procianidina B1 e procianidina B2, foram comprados da Extrasyntese[®] (Genay, França). Todos os padrões adquiridos continham grau de pureza igual ou acima de 95%.

2.3. Elaboração do hidromel

Foi elaborado um mosto a partir do mel diluído em água mineral com concentração de sólidos solúveis de 22^oBrix para a produção de teor alcóolico ao redor de 12%. Em seguida, o mosto foi sulfitado com a incorporação de 75mg L⁻¹ do

conservante metabissulfito de potássio e o pH ajustado a 3,6 com adição de 0,116g L⁻¹ de ácido tartárico. Logo após, o mosto foi distribuído em seis garrações de 10L para a elaboração de três tratamentos em duplicata: H1 – controle; H2 – controle + polén apícola (30g L⁻¹); H3 – controle + fosfato de amônio (0,4 g L⁻¹).

Posteriormente, os tratamentos foram levados a fermentação em câmara a temperatura controlada de 18±2°C, como recomendado por Czabaj et al. (2017). Após 24h, foi feita adição do pólen no tratamento H2, conforme concentração utilizada por Roldán et al. (2011), e do fosfato de amônio em H3 de acordo com a concentração máxima indicada pelo fabricante, de acordo com o ilustrado na Figura 1.



Figura 1. (A) Mostos em fermentação (fase tumultuosa), (B) Avaliação sensorial dos mostos.

O processo fermentativo foi dado como encerrado quando as amostras demonstraram densidade constante, abaixo 1,000, e teor de açúcar redutor menor que 8g L⁻¹. Ao final do processo fermentativo, os fermentados tiveram a acidez total corrigida com ácido láctico para 60 mEq L⁻¹, para atingirem o limite da legislação brasileira

(BRASIL, 2012), e seguiram para a estabilização proteica e clarificação durante 30 dias em câmara a temperatura controlada ($4\pm 1^\circ\text{C}$), após a adição de $1,1\text{g L}^{-1}$ de sílica coloidal e $0,4\text{g L}^{-1}$ de gelatina líquida. Em seguida, os hidroméis foram trasfegados, envasados em garrafas de vidro de 750mL, mantidos em adega climatizada (18°C) e analisadas após 30 dias.

2.4. Parâmetros Físico-químicos

Para determinação do final do processo de fermentação, foram realizadas análises de densidade e teor de açúcar redutor. A determinação da densidade foi realizada por leitura direta das amostras em balança eletrônica hidrostática Super Alcomat (Gibertini Elettronica, Itália) (OIV, 2019), enquanto o teor de açúcar redutor foi obtido através da reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Após um mês do engarrafamento, três garrafas de cada lote por tratamento foram analisadas quanto a acidez total, acidez volátil, pH, teor alcoólico, extrato seco, teor de açúcar redutor, anidrido sulfuroso livre e total.

A acidez total foi realizada por titulação com hidróxido de sódio 0,1N até pH 8,2 utilizando fenolfitaléina como indicador (AOAC, 2000). Os valores obtidos foram expressos em mEq L^{-1} de ácido láctico. A acidez volátil foi realizada por titulação seriada, após destilação da amostra em destilador enológico Super DEE (Gibertini Elettronica, Itália), com hidróxido de sódio 0,1N e fenolfitaléina, iodo 0,02N em presença de amido, e iodo 0,02 N e tetraborato de sódio (OIV, 2019). Os valores obtidos foram expressos em mEq L^{-1} de ácido acético. O pH foi determinado a partir da leitura direta das amostras em pHmetro HI2020 (Hanna Instruments, Estados Unidos) e os valores expressos com duas casas decimais (OIV, 2019). O teor alcoólico e extrato seco, foram realizados após destilação em destilador enológico Super DEE (Gibertini Elettronica, Itália) por densimetria e leitura direta em balança eletrônica hidrostática Super Alcomat (Gibertini Elettronica, Itália) (OIV, 2019). Os valores foram expressos em % (v/v) de álcool e g L^{-1} de extrato seco. O teor de açúcar redutor foi obtido através da reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e os valores expressos em g L^{-1} . A determinação de anidrido sulfuroso (SO_2) total foi realizada após destilação em destilador enológico Super DEE (Gibertini Elettronica, Itália) pelo método de Ripper (iodometria) por

titulometria com solução de iodo 0,02N como indicador (OIV, 2019), tendo os valores expressos em g L⁻¹.

2.5. Avaliação Colorimétrica

As análises de cor foram realizadas utilizando o sistema CIELab (OIV, 2019) para determinação dos parâmetros: L* (luminosidade), a* (coordenada vermelho/verde), b* (coordenada amarelo/azul), C* (cromaticidade ou saturação) e ângulo H* (hue ou tonalidade). As amostras foram analisadas em triplicata, sendo acondicionadas em cubeta e as leituras realizadas em colorímetro portátil Delta Vista 450G (Delta Color), previamente calibrado.

2.6. Determinação de Compostos Fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) dos hidroméis foi determinado a partir do método proposto por Singleton & Rossi (1965) com modificações. Foram pipetados 100µL de amostra e 400µL de acetona 70% em tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 2500µL de reagente de *Folin-Ciocalteu* 10% e 2000µL de solução de carbonato de sódio 7,5% em cada tubo. Após 2 horas, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA) a 760nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) L⁻¹ a partir da curva de calibração obtida com concentrações do padrão do composto variando entre 1,5 a 8,0 µg mL⁻¹.

Dezessete compostos fenólicos foram quantificados isoladamente seguindo o método otimizado nas mesmas condições analíticas por Natividade et al (2013). As análises foram realizadas utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters Alliance e2695 (Waters, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) Waters 2998 nos comprimentos de onda de 280nm, 320nm e 360nm, e detector de fluorescência Waters 2475 utilizando 280nm para excitação e 320nm na emissão. As amostras foram filtradas em membrana de nylon com diâmetro de 13mm e tamanho do poro de 0,45µm (Phenomenex, EUA) e injetadas sem diluição no equipamento utilizando como volume de injeção 40µL. A coluna Gemini NX C-18 (Phenomenex, EUA: 150mm × 4,6mm × 3µm) foi mantida a 40°C. A fase móvel consistiu em um gradiente composto por um solvente A (solução de ácido ortofosfórico a 0,85%)

e um solvente B (acetonitrila) em fluxo a $0,5\text{ml min}^{-1}$. O gradiente teve início com 100% do solvente A e foi ajustado para 93% do solvente A e 7% do solvente B em 10 min; 90% do solvente A e 10% do solvente B em 20 min; 88% do solvente A e 12% do solvente B em 30 min; 77% do solvente A e 33% do solvente B em 40 min; 65% do solvente A e 35% do solvente B em 45 min; e 100% do solvente B em 55 min (totalizando 60 minutos de corrida).

A detecção dos compostos fenólicos foi realizada comparando os espectros e os tempo de retenção dos picos das amostras com os dos padrões injetados nas mesmas condições analíticas. A quantificação foi realizada através das curvas de calibração dos padrões (NATIVIDADE et al., 2013; COSTA et al., 2020), tendo a linearidade variado de 0,62 - 160,00 mg L^{-1} e os coeficientes de regressão (R^2) entre 0,9977 e 0,9999. Os limites teóricos de detecção (LOD) variaram entre 0,03 e 0,27 mg L^{-1} , enquanto os limites teóricos de quantificação (LOQ) encontravam-se entre 0,09 e 0,89 mg L^{-1} ; tendo as médias dos valores de recuperação variado de 97,67 a 99,64% (ácidos fenólicos), 92,31 a 99,31% (flavanóis) e 92,33 a 115,37% (flavonóis). A precisão do método (RSDR) variou de 1,27 a 3,19% nas amostras.

2.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante in vitro

2.7.1. Ensaio pelo método DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada a partir de adaptação feita por Carvalho et al (2020) da metodologia proposta por Brand-Williams et al (1995). Foram pipetadas alíquotas $100\mu\text{L}$ de amostra e $3900\mu\text{L}$ de solução de DPPH $0,06\text{mM mL}^{-1}$ em tubos de ensaio. Após 1 hora, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA) a 515nm. Os resultados foram expressos em mmol TE L^{-1} a partir de curva de calibração utilizando trolox (TE) como padrão em concentrações variando de 0 a 5 mg mL^{-1} .

2.7.2. Ensaio pelo método ABTS

A capacidade antioxidante também foi quantificada conforme metodologia adaptada de Re et al. (1999) por Lima et al. (2014) pelo método ABTS. O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi preparado previamente até obter absorvância de $0,700 \pm 0,050\text{nm}$ a 734nm para

utilização. As amostras foram analisadas em triplicata, transferindo-se 30 μ L de cada amostra para tubos de ensaio com 3000 μ L do radical ABTS^{•+}. Após 6 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA) a 734nm. A partir das absorbâncias obtidas, o percentual de inibição do radical ABTS^{•+} foi determinado e os valores plotados na curva de calibração construída utilizando como padrão o trolox em concentrações entre 0 e 2 mmol L⁻¹. Os resultados obtidos foram expressos em mmol TE L⁻¹.

2.7.3. Ensaio pelo método FRAP

Para o método FRAP, a determinação da capacidade redutora foi realizada pela metodologia proposta por Benzie & Strain (1996a; 1999b) adaptada por Thaipong et al (2006). A partir das soluções de tampão acetato 300 mM mL⁻¹, TPTZ 10 mM mL⁻¹ e cloreto férrico 20 mM mL⁻¹, foi preparado o reagente FRAP e aquecido a 37°C antes da utilização. Foram pipetadas alíquotas de 150 μ L de amostra de hidromel diluída em tubos de ensaio e adicionado 2850 μ L do reagente FRAP. Após 30 minutos, a leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA) a 593nm. Os resultados foram expressos em mmol TE L⁻¹ a partir da curva de calibração construída com padrão de trolox em concentrações variando entre 25 μ mol e 800 μ mol L⁻¹.

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o software estatístico XLStat (Addinsoft. XLSTAT statistical and data analysis solution, Long Island, NY, USA, 2015). Adicionalmente, Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada aos dados de determinação de cor, teores de compostos fenólicos totais e por grupo de fenóis, além da capacidade antioxidante, utilizando o mesmo software estatístico.

3. Resultados e Discussão

3.1. Parâmetros Físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos analisados encontram-se na Tabela 1. Todos os tratamentos atenderam aos limites estabelecidos pela legislação brasileira para hidromel (BRASIL, 2012).

Tabela 1. Composição físico-química e avaliação colorimétrica dos diferentes tratamentos de hidromel.

Parâmetro Físico-químico ²	Códigos dos Tratamentos ¹		
	H1	H2	H3
Duração da fermentação (dias)	28	21	17
Densidade (g cm ⁻³)	0,998±0,000b	0,999±0,000a	0,997±0,000c
Açúcar Redutor (g L ⁻¹)	6,898±0,249a	6,972±0,214a	6,901±0,271a
Acidez Total (mEq L ⁻¹)	56,850±1,532a	57,674±0,511a	54,296±0,486b
Acidez Volátil (mEq L ⁻¹)	9,800±0,115a	7,983±0,282b	8,245±0,382b
pH	3,235±0,016b	3,557±0,031a	3,125±0,005c
Teor alcoólico (% v/v)	10,788±0,078b	11,122±0,090b	11,650±0,254a
Anidrido Sulfuroso Total (g L ⁻¹)	0,233±0,005a	0,197±0,008b	0,130±0,008c
Extrato Seco (g L ⁻¹)	31,683±0,519c	36,900±0,994a	33,083±0,634b
Cor L*	50,923±0,391a	37,165±1,638b	51,295±0,183a
Cor a*	-1,173±0,151b	3,020±0,610a	-1,308±0,165b
Cor b*	14,201±0,395b	26,683±1,413a	13,799±0,277b
Cor h	94,728±0,655a	83,473±1,582b	95,420±0,720a
Cor C*	14,242±0,397b	26,863±1,349a	13,861±0,270b

¹ H1 = sem adição da levedura e aditivo. H2 = sem adição da levedura e com adição de 30 g L⁻¹ de pólen. H3 = sem adição da levedura e com adição de 0,5 g L⁻¹ de fosfato de amônio. ² Médias ±desvio padrão em comum em uma mesma linha indicam tratamentos que não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p≤0,05).

A duração da fermentação variou de 17 à 28 dias. As limitações de nutrientes essenciais, o estresse osmótico, o estresse oxidativo, a privação de nitrogênio e a toxicidade ao etanol, são condições de stress desfavoráveis ao crescimento das leveduras que promovem atrasos na fermentação da bebida (PEREIRA, 2009). Desta forma, era previsível que o tratamento H1 (controle) resultasse em uma duração mais longa do processo fermentativo em comparação com os demais tratamentos (H2 e H3) que receberam a adição de compostos nitrogenados. Dentre os tratamentos H2 e H3, o

tratamento H3 foi o que teve a fermentação mais curta, atribuindo-se o fato a padronização da composição do ativador de fermentação em relação ao pólen.

Todas as densidades, apesar de apresentarem diferença significativa entre as amostras, apresentarem valores próximos entre sim e abaixo de $1,000 \text{ cm}^3$. O teor de açúcar variou de 6,898 a $6,972 \text{ g L}^{-1}$, não havendo diferença significativa entre as amostras. Todos os tratamentos foram classificados como suaves segundo a legislação (BRASIL, 2012), pois seus teores de açúcar são superiores a 3 g L^{-1} . Gomes et al (2015) relataram que o alto teor de açúcar aumentou a aceitação do hidromel entre seus consumidores, assemelhando-se ao resultado relatado por Vidrih e Hribar (2007), cujo painel de teste teve preferência por hidromel com maior teor de açúcar redutor. Os resultados obtidos se mostraram diferentes dos de Róldan et al. que obtiveram valor menor que 6 g L^{-1} em hidromel fermentado com a mesma concentração de pólen através de levedura comercial, evidenciando que, mesmo havendo suplementação entre as amostras H2 e H3, houve baixo consumo dos açúcares indicando que a falta de uniformidade na composição da cultura pode ter resultado nos teores de açúcar obtidos, uma vez que a escolha da cepa de levedura também é importante para que haja boa capacidade de adaptação dos microrganismos mesmo em condições de crescimento desfavoráveis (PEREIRA et al., 2015).

Os valores de acidez total e volátil são importantes parâmetros de qualidade nos hidroméis. Os ácidos orgânicos influenciam a taxa de fermentação, estabilidade e a sanidade microbiológica, bem como as propriedades sensoriais da bebida (DOBROWOLSKA-IWANIEK, 2015). A acidez total dos hidroméis produzidos (H1, H2 e H3) apresentou valores de 54,296 a $57,674 \text{ mEq L}^{-1}$, destacando o tratamento H2 como aquele que manteve o maior valor do teor inicial de ácidos orgânicos na bebida, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) apenas do tratamento H3. Ressalta-se que a acidez total de todos os tratamentos foi corrigida com ácido láctico para 60 mEq L^{-1} anteriormente ao engarrafamento (item 2.3.), uma vez que o mel tem uma concentração naturalmente baixa de ácidos orgânicos (SROKA & SATORA, 2017).

Em relação a acidez volátil, os valores variaram entre 7,983 e $9,8 \text{ mEq L}^{-1}$, havendo o tratamento com adição de pólen (H2) obtido o menor valor, diferindo significativamente da amostra controle (H1). A acidez volátil não deve exceder de 20 mEq L^{-1} de ácido acético (BRASIL, 2012), uma vez que a formação deste ácido tem efeito depreciativo sobre o produto (RIBÉREAU-GAYON et al, 2006).

Os valores de pH variaram de 3,125 a $3,557 \pm 0,01$, tendo a amostra H2 apresentado o valor mais alto e diferença significativa entre as amostras H1 e H3. Segundo Zoecklein et al (1999), o pH tem um significativo impacto no vinho: pH baixo impede o desenvolvimento de microrganismos, enquanto aumenta a fração antisséptica de dióxido de enxofre, além de promover a estabilidade e longevidade da bebida.

Os hidroméis obtiveram teor alcoólico entre 10,788 a 11,650% (v/v), tendo o tratamento com adição de ativador de fermentação (H3) o maior valor e apresentando diferença significativa entre os demais tratamentos. O conteúdo de etanol tem importante papel na preservação e extração dos compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos, além de poder influenciar na absorção destes compostos pelo corpo humano (CZABAJ et al., 2017; MOTILVA et al, 2016).

Os valores de anidrido sulfuroso (SO_2) total variaram de 0,13 a $0,233 \text{ g L}^{-1}$, destacando-se o tratamento H1, cujo valor foi o mais alto, apresentando diferença significativa dentre os demais, indicando que no tratamento controle houve maior necessidade de controle microbiológico em relação as demais amostras, tendo em vista que a falta da suplementação com nutrientes deixou o tratamento mais suscetível a ação de microrganismos indesejáveis.

Com relação ao extrato seco, os valores variaram entre 31,683 e $36,9 \text{ g L}^{-1}$, tendo o tratamento H2 apresentado diferença significativa dos demais tratamentos, possuindo o maior teor de extrato seco. Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006), o extrato seco inclui substâncias orgânicas não voláteis e compostos minerais, sendo os compostos minerais necessários como cofatores para várias vias metabólicas que influenciam a taxa de conversão de açúcar e, assim, a formação de álcool (PEREIRA et al, 2010), corroborando com os resultados encontrados.

3.2. Avaliação Colorimétrica

Os valores observados para os parâmetros de cor foram indicados na Tabela 1, podendo ser observados a ilustração da coloração visual na Figura 2.



Figura 2. (A) Amostras H2 e H3 (da esquerda para direita).

O componente de luminosidade L^* apresentou valores mais altos (50,923 e 51,295) nos tratamentos H1 e H3, sendo os mais claros e não havendo diferença significativa entre eles, enquanto o tratamento H2 apresentou o valor mais baixo (37,165), sendo o mais escuro, diferindo significativamente dentre todos os tratamentos. Os valores do componente a^* foram negativos (cor verde) nas amostras H1 e H3, não apresentando diferença significativa entre estes, e positivos (cor vermelha) na amostra H2, sendo significativamente diferente das demais, enquanto os valores do componente b^* foram positivos (cor amarela) em todos os tratamentos, sendo H2 significativamente mais amarelo que os demais.

Com relação ao valor de cromaticidade (C^*), verificou-se que os valores foram baixos nas amostras H1 e H3 (14,242 e 13,861), indicando menor saturação e não mostrando diferença significativa entre elas, enquanto a amostras H2 apresentou maior valor (26,863), indicando maior vivacidade da coloração e sendo significativamente diferentes das demais amostras. Quanto ao componente h , relativo à tonalidade, todos os tratamentos encontraram-se bem afastadas do ângulo 0° (vermelho), tendendo a direção do eixo 90° (amarelo), concordando com as médias apresentadas para o componente b^* .

Martín et al. (2008) concluíram ao analisar o perfil fenólico de vinhos brancos que a quantidade de compostos fenólicos possuem correlação com as coordenadas CIELAB, sugerindo que vinhos brancos com maior teor de compostos fenólicos exibiriam tonalidades mais amareladas, do mesmo modo que Roldán et al. (2011) verificaram que a alteração da cor do hidromel elaborado com pólen, concluindo que os compostos

fenólicos presentes no pólen são de grande importância para a cor, adstringência e propriedades antioxidantes, estando altamente correlacionados.

3.3. Compostos Fenólicos

O conteúdo de CFT dos hidroméis foi listado na Tabela 2, variando de 231,33 a 751,829 mg EAG L⁻¹.

Tabela 2. Compostos fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos individuais ($n=17$) determinados por HPLC-DAD-FD nos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha *Apis mellifera*.

Compostos Fenólicos (mg L ⁻¹)	Hidromel ^{1,2}		
	H1	H2	H3
Ácido Gálico	1,429±0,103ab	1,542±0,165a	1,245±0,149b
Ácido Cafeico	0,253±0,006b	0,350±0,013a	0,227±0,002c
Ácido Caftárico	0,177±0,030b	2,097±0,110a	0,159±0,010b
Ácido ρ -Cumárico	0,136±0,003b	0,197±0,009a	0,128±0,004c
Ácido Ferúlico	0,149±0,003b	0,389±0,023a	0,145±0,001b
Ácido Clorogênico	0,173±0,005b	0,191±0,009a	0,170±0,002b
Total de Ácidos Fenólicos	2,317±0,104b	4,766±0,046a	2,075±0,055b
Caempferol-3-O-glucosídeo	0,132±0,007b	0,199±0,009a	0,122±0,001c
Isorhamnetina-3-O-glucosídeo	ND	0,134±0,002	ND
Miricetina	ND	0,209±0,001	ND
Quercetina-3- β -D-glucosídeo	0,223±0,012b	23,535±1,194a	0,214±0,007b
Rutina	0,583±0,029b	0,708±0,023a	0,523±0,017c
Total de Flavonóis	0,938±0,232b	24,785±1,223a	0,859±0,114b
(+)-Catequina	0,260±0,014b	0,322±0,006a	0,249±0,002c
(-)-Epicatequina	0,229±0,003b	0,233±0,001a	0,235±0,002a
(-)-Galato Epicatequina	ND	1,649±0,065	ND
(-)-Galato Epigalocatequina	1,248±0,066a	0,987±0,086b	1,093±0,043b
Procianidina B1	0,468±0,006b	0,520±0,009a	0,461±0,005b
Procianidina B2	0,408±0,001b	0,472±0,038a	0,429±0,004b
Total de Flavanóis	2,613±0,156b	4,183±0,014a	2,466±0,042c
Fenólicos Totais (mg EAG L⁻¹)³	231,330±10,562c	751,829±18,816a	250,360±7,538b

¹ H1 = sem adição da levedura e aditivo. H2 = sem adição da levedura e com adição de 30 g L⁻¹ de pólen. H3 = sem adição da levedura e com adição de 0,4 g L⁻¹ de fosfato de amônio. ² Médias \pm desvio padrão em comum em uma mesma linha indicam tratamentos que não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ³ Total de compostos fenólicos detectado por método espectrofotométrico. ND = não detectado.

O hidromel que foi produzido com adição de pólen (H2), apresentou o maior conteúdo de CFT, cerca de três vezes superior, indicando que a adição de pólen causou um aumento significativo no conteúdo desses compostos conforme o ilustrado na Figura

3. Os grãos de pólen de fato são ricos em compostos fenólicos (AMORES-ARROCHA et al., 2018). Socha et al. (2015) avaliou cinco hidroméis comerciais do estilo “trójniaki”, e encontrou a maior concentração CFT naquele elaborado com adição de suco de sorva ($21,51\text{mg L}^{-1}$), enquanto Kawa-Rygielska et al. (2019) obteve em hidromel produzido a partir de mel multifloral, tratamento térmico (100°C por 90 min), e adição de semente de uva, valores de CFT entre 200 a 250mg L^{-1} . Estes valores citados também foram bem inferiores aos conteúdos de CFT de H2.

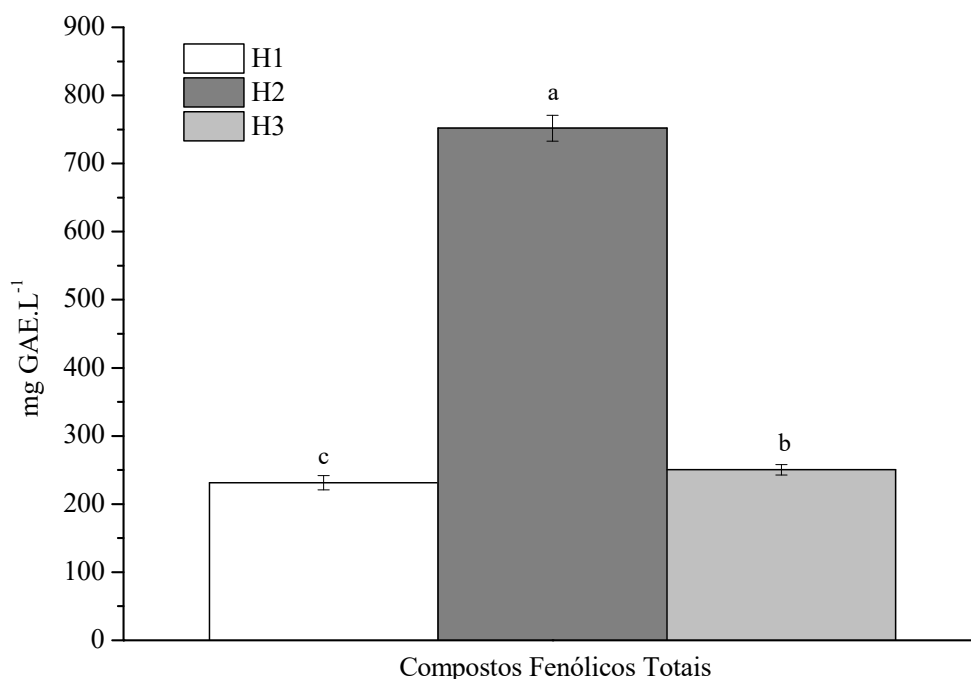


Figura 3. Conteúdo de compostos fenólicos totais dos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha *Apis mellifera* determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (mg EAG L^{-1}). Letras diferentes indicam amostras que apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Tratamentos: H1 = sem adição da levedura e aditivo. H2 = sem adição da levedura e com adição de 30 g L^{-1} de pólen. H3 = sem adição da levedura e com adição de $0,4\text{ g L}^{-1}$ de fosfato de amônio. EAG = Equivalente de Ácido Gálico.

O hidromel fermentado sem a adição de pólen ou fosfato de amônio (H1), apresentou o menor teor de CFT, entretanto, similar aos encontrados em estudo comparativo entre amostras de vinho branco comercial ($227,50\text{mg L}^{-1}$) e hidromel comercial ($232,07\text{mg L}^{-1}$) analisados por Wintersteen et al. (2005). Por outro lado, a adição de fosfato de amônio ao hidromel (H3), apesar de promover à bebida valores significativamente maiores de CFT do que o tratamento H1, contribuiu pouco para

incrementar esses compostos no produto, principalmente quando comparado ao pólen. O valor de CFT encontrado em H3 é similar aos encontrados em hidroméis analisados por Czabaj et al. (2017).

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que o conteúdo de CFT das amostras foi determinado, principalmente, pelos aditivos acrescentados. Adicionar compostos nitrogenados na produção de hidromel é uma prática comum devido a necessidade de fornecer nutrientes as leveduras e estimular a cinética fermentativa, além de melhorar as características da bebida (MENDES-FERREIRA et al., 2010; ROLDÁN et al., 2011).

Foram detectados e quantificados dezessete compostos fenólicos nos hidroméis pertencentes aos grupos dos não flavonóides (ácidos fenólicos) e flavonóides (flavonóis e flavanóis) (Tabela 2). Os hidroméis apresentaram perfis fenólicos semelhantes para os tratamentos H1 e H3, enquanto o tratamento com adição de pólen, H2, diferenciou-se em relação aos demais, por conter maior variedade desses compostos e apresentar concentrações superiores.

Os compostos fenólicos são relatados como os principais constituintes do mel, e derivam do néctar floral, pólen e própolis (NASCIMENTO et al., 2018). O perfil de compostos fenólicos no mel foi largamente estudado, tendo sido encontrados, majoritariamente, os ácidos gálico, cafeico, ρ -cumárico, ferúlico e clorogênico, além de quercetina, caempferol-3-O-glucosídeo, miricetina, dentre outros (SILVA et al, 2016). Por outro lado, a composição do mel varia conforme sua origem botânica, espécie da abelha e condições climáticas do local de produção. Desta forma, os resultados sugerem que a maioria dos compostos fenólicos detectados nos hidroméis possam ser provenientes do mel utilizado, uma vez que Starowicz & Granvogl (2020) reportaram que o mel usado para a produção de hidromel contribui significativamente para os compostos fenólicos, tendo em vista que, pelo menos, 5.000 flavonóides e ácidos fenólicos foram descritos no mel.

A soma de ácidos fenólicos atingiu o maior valor no hidromel H2, sendo mais de duas vezes superior em relação aos demais (Tabela 3). O ácido gálico destacou-se dentre os ácidos fenólicos, sendo detectado em todas as amostras de hidromel, em concentrações que variaram entre 1,245 e 1,542mg L⁻¹. Este composto tem várias propriedades bioativas, atividades bacteriostáticas e antioxidantes (HELENO et al, 2015). Por outro lado, o ácido caftárico apresentou valor superior no tratamento H2, sendo o ácido fenólico majoritário nesse hidromel, indicando que a adição de pólen contribui para

o aumento deste composto na bebida. Este composto é altamente oxidável e responsável pelo escurecimento de vinhos brancos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), podendo levar a bebida a uma coloração acastanhada. Entretanto, este ácido é relacionados a inúmeras propriedades funcionais, possuindo efeito neuroprotetor e hepatoprotetor, antiinflamatório, antimutagênico e anticarcinogênico, antidiabético e anti-hipertensivo, além de antioxidante (KORIEM, 2020). Em estudo realizado por Švecová et al. (2015) foram analisados vinte e duas amostras de hidroméis do tipo tradicional, envelhecido e com adição de frutas e ervas, sendo detectados os ácidos gálico, cafeico, ferúlico e p-cumárico, entretanto, apenas a amostra, hidromel com adição de cassis, apresentou valores superiores em todos estes ácidos fenólicos em relação aos tratamentos avaliados neste estudo .

De acordo com a Tabela 2, a soma dos flavonóis quantificados também apresentou-se maior no tratamento onde foi adicionado pólen ao hidromel (H2). Isorhamnetina-3-O-glucosídeo e miricetina foram detectados apenas no tratamento H2, enquanto o teor de quercetina neste tratamento apresentou-se bastante superior em relação aos demais, sugerindo influência da adição do pólen no conteúdo desses três compostos. Freire et al. (2012) identificaram a presença de caempferol-3-O-glucosídeo, isorhamnetina-3-O-glucosídeo, miricetina, quercetina e rutina em amostras de pólen brasileiro, demonstrando que o aumento significativo do teor de rutina e caempferol-3-O-glucosídeo na amostra H2, pode ter ocorrido em função da presença de pólen nesses hidroméis. A quercetina, miricetina e isorhamnetina-3-O-glucosídeo estão bem estabelecidos na literatura como potentes antioxidantes em vinho, atuando na inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em humanos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; WINTERSTEEN et al., 2005). Adicionalmente, os flavonóis são pigmentos naturais responsáveis pela coloração amarela (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), assim, a quantidade mais elevada destes compostos no tratamento H2 sugere uma coloração mais intensa nessa amostra em relação as demais em virtude do pólen adicionado, corroborando com os resultados obtidos da análise colorimétrica (item 3.2.).

A somatória dos flavanóis quantificados atingiram os maiores valores no tratamento H2 (Tabela 2). Este resultado sugere maior presença de amargor e adstringência nas amostras de hidromel com pólen, uma vez que o conteúdo destes compostos são associados a essas percepções (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Dentre

os compostos detectados, a (-)-galato epigalocatequina apresentou-se de modo geral como o flavanol majoritário, enquanto a (-)-galato epicatequina foi detectada apenas na amostra H2, indicando o origem deste composto no pólen. A ingestão de flavanóis e seus derivados polimerizados (prociadininas e taninos), resulta em benefícios à saúde cardiovascular humana, entretanto, são as formas monoméricas da (+)-catequina e (-)-epicatequina (OTTAVIANI et al., 2011). Neste sentido, foram quantificados neste trabalho a (-)-epicatequina, (+)catequina, procianidina B1 e procianidina B2. A presença de flavanóis em hidroméis ainda é pouco verificada, tendo sido quantificados apenas (+)-catequina e procianidinas, conforme os estudos de Akalın et al. (2017) e Kahoun et al. (2008), cujos valores de (+)-catequina encontrados foram, respectivamente, 0,01 a 0,12mg L⁻¹ em hidroméis de diferentes tipos de meles e 0,44 a 0,59mg L⁻¹ em hidroméis que continham própolis, enquanto Kawa-Rygielska et al. (2019) apresentou o valor de procianidinas de 14,04mg L⁻¹ em hidromel com adição de semente de uva.

3.4. Capacidade Antioxidante

Os valores de capacidade antioxidante analisados com os ensaios *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP estão representados na Figura 4. No ensaio por DPPH a capacidade antioxidante das amostras variou de 0,294 a 0,493 mmol TE L⁻¹. O sequestro do radical DPPH foi significativamente maior na amostra de hidromel elaborada com adição de pólen (H2). A capacidade antioxidante dos hidroméis estimada por ABTS apresentou variação de 0,395 a 0,743 mmol TE L⁻¹. Foi observado que o maior valor no sequestro do ABTS^{•+} ocorreu também no tratamento H2. A variação entre os métodos baseados pela captura de radical orgânico, pode ser explicado pelo fato do DPPH ser utilizado para estimar a atividade de eliminação de radicais de forma abrangente, enquanto o ABTS é usado para avaliar especificamente a atividade de fenólicos, principalmente flavonóides (BAIANO & VARVA, 2019). O poder redutor de Fe²⁺ apresentado pelo FRAP nas amostras variou 0,667 a 1,245 mmol TE L⁻¹. Novamente foi observado que o valor obtido pela capacidade de redução de Fe²⁺ foi maior na amostra H2, uma vez que este tratamento possui o maior teor de flavonoides, que são catalizadores de quelatos metálicos (PAIXÃO, 2007).

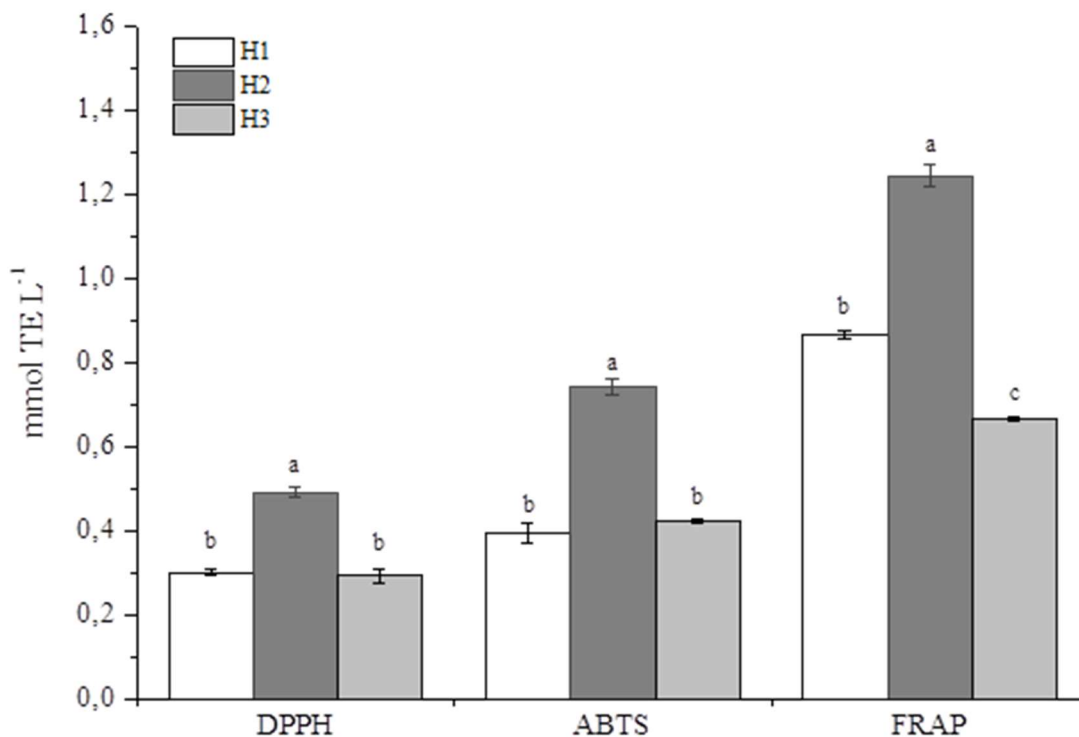


Figura 4. Capacidade antioxidante dos diferentes tratamentos de hidroméis elaborados a partir de mel de abelha *Apis mellifera* determinados pelos ensaios *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP (mmol TE L⁻¹). Letras em comum para um mesmo ensaio antioxidante indicam amostras que não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Tratamentos: H1 = sem adição da levedura e aditivo. H2 = sem adição da levedura e com adição de 30 g L⁻¹ de pólen. H3 = sem adição da levedura e com adição de 0,4 g L⁻¹ de fosfato de amônio. TE = Trolox.

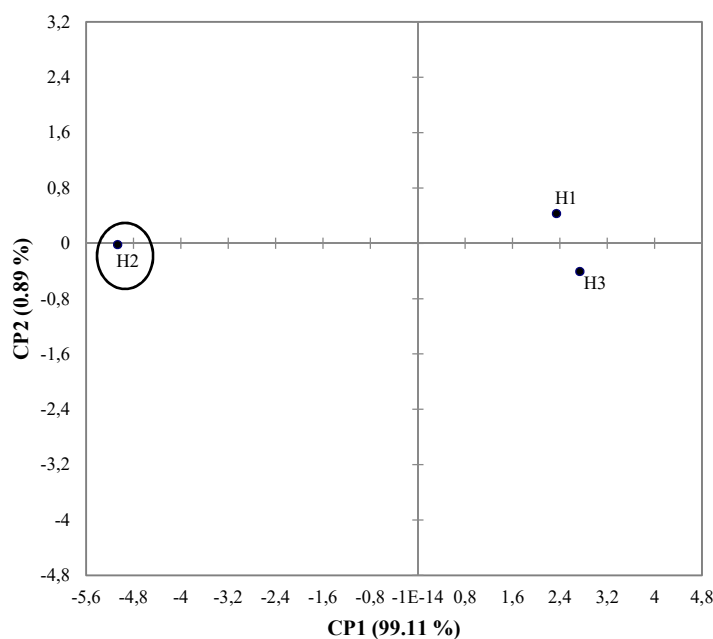
Os resultados obtidos em todos os três métodos apresentam valores significativamente mais altos nos tratamentos com presença de pólen, sendo este aditivo indicado para aumentar a capacidade antioxidante em hidroméis, corroborando com o resultado do conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras, uma vez que a concentração fenólica se correlaciona fortemente com a capacidade antioxidante de alimentos e vinhos de acordo com a literatura (WINTERSTEEN et al., 2005; ROLDÁN et al, 2011). Em estudo realizado por Kawa-Rygielska et al. (2019), o hidromel com adição de semente de uva apresentou valores de capacidade antioxidante similares aos encontrados nos tratamentos H2 e H5 pelos métodos DPPH e FRAP, entretanto, superiores aos obtidos no método ABTS.

3.5. Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP foi utilizada para diferenciar as amostras de hidroméis com relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais e por classe fenólica, capacidade antioxidante e cor. Os dois primeiros componentes principais explicaram 100,00% da variação total dos dados, sendo 99,11 e 0,89% da variação explicados por CP1 e CP2, respectivamente. A proximidade entre as amostras H1 e H3 na Figura 4A indica que esses hidroméis possuem similaridade em relação as variáveis estudadas, diferentemente da amostra H2, distante das demais. Desta forma, foi observado que os hidroméis se separaram pela CP1 em função da composição das amostras, sendo formado dois grupos, claramente diferenciados quanto a presença de pólen.

Dentre os compostos analisados nos hidroméis (Fig.4B), a amostra H2 destacou-se quanto ao conteúdo de fenólicos totais e por classe fenólica, e também quanto a capacidade antioxidante pelos três métodos de ensaio *in vitro*. Vale ressaltar que o conteúdo de compostos fenólicos apresentou forte relação com os resultados de cor e capacidade antioxidante. Assim, os resultados da ACP (Fig. 4 A e B) sugerem que a variação ocorrida nas variáveis analisadas nos hidroméis foi fortemente influenciada pela adição de pólen.

(A)



(B)

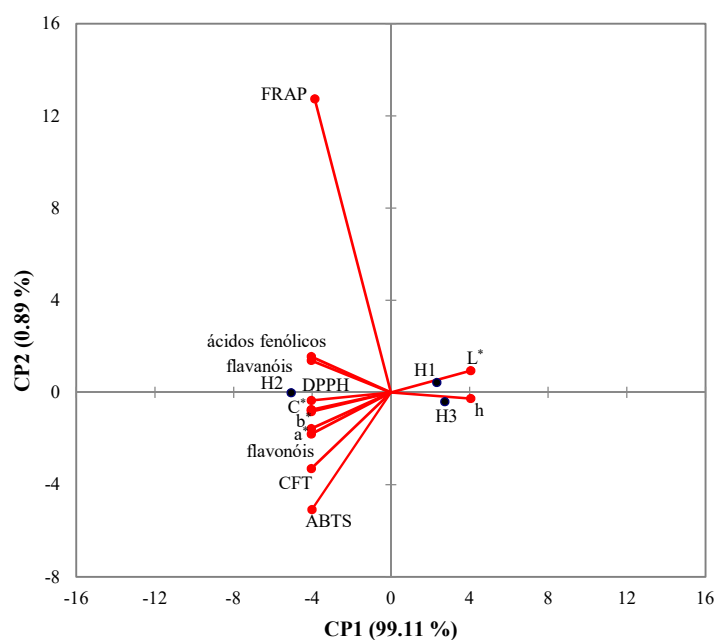


Figura 5. (A) Gráfico dos escores das amostras e (B) Gráfico de interação das variáveis obtidas através de análise de componentes principais (ACP) com base na composição fenólica total e por classe, capacidade antioxidante e cor dos hidroméis de abelha *Apis mellifera*. Tratamentos: H1 = sem adição da levedura e aditivo. H2 = sem adição da levedura e com adição de 30 g L⁻¹ de pólen. H3 = sem adição da levedura e com adição de 0,4 g L⁻¹ de fosfato de amônio. CFT= compostos fenólicos totais

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é importante para as propriedades anti envelhecimento e funcionais do hidromel (SALMON et al, 2010). Ademais, a presença de fenólicos contribui para aprimorar o sabor, tornar a textura mais licorosa e melhorar a estabilidade da bebida. Entretanto, o teor excessivo de compostos fenólicos pode resultar em surgimento de turbidez no hidromel e precipitação, através de interações desses compostos com moléculas de proteína, além de adstringencia excessiva e amargor, como também induzir a uma coloração escura e não atraente (CAI et al., 2019).

4. Conclusão

O estudo realizado demonstrou que o conteúdo de compostos fenólicos totais e individuais, assim como a capacidade antioxidante, variaram significativamente no hidromel em função do tipo de aditivo indutor da fermentação empregado. Dezesete compostos fenólicos foram identificados e quantificados no hidromel, entre ácidos

fenólicos, flavonóis e flavanóis, destacando a presença dos seguintes compostos: ácido caftárico, caempferol-3-O-glucosídeo, isorhamnetina-3-O-glucosídeo, miricetina, quercetina-3-β-D-glucosídeo, rutina, (-)-epicatequina, (-)-galato epicatequina e (-)-galato epigalocatequina. De acordo com a ACP, a adição de pólen aumentou o conteúdo de compostos fenólicos e melhorou a capacidade antioxidante do hidromel. Apenas nestas amostras foram detectados isorhamnetina-3-O-glucosídeo, miricetina e (-)-galato epicatequina, além de terem apresentado aumento substancial no teor de quercetina-3-β-D-glucosídeo. Desta forma, os resultados desse estudo recomendam a adição de pólen ao hidromel para melhorar a qualidade funcional da bebida.

Referências

AKALIN, H.; BAYRAM, M.; 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**, 123(1), 167–174, 2017.

AMORES-ARROCHA, A.; ROLDÁN, A.; JIMÉNEZ-CANTIZANO, A.; CARO, I.; PALACIOS, V. Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of Palomino fino and Riesling white young wines. **Food Research International**, 105, 197–209, 2018.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17th ed, 2000.

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

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, 239, 70–76, 1996a.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J.[2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, 299, 15–27, 1999b.

BLAZQUEZ ROJAS, I.; SMITH, P.A.; BARTOWSKY, E.J. Influence of choice of yeasts on volatile fermentation-derived compounds, colour and phenolics composition in Cabernet Sauvignon wine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(12), 3311–3321, 2012.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28(1), 25–30, 1995.
- CAI, H.; ZHANG, Q.; SHEN, L.; LUO, J.; ZHU, R.; MAO, J.; ZHAO, M.; CAI, C. Phenolic profile and antioxidant activity of Chinese rice wine fermented with different rice materials and starters. **LWT- Food Science and Technology**, 111, 226–234, 2019.
- CAPILLA, P.; ARTIGAS, J. M.; PUJOL, J.; LUQUE, M. J.; MALO, J.; MARTINEZ-VERDU, F. **Fundamentos de Colorimetría**. Servei de Publicacions de la Universitat de Valencia (2002).
- CARVALHO, E.S.S.; BIASOTO, A.C.T.; NASSUR, R.C.M.R.; BARROS, A.P.A.; LEÃO, P.C.S.; LIMA, E.S.; CAMARGO, A.C.; MAMEDE, M.E.O. Physicochemical characteristics, phenolic profile, and antioxidant capacity, of Syrah tropical wines: Effects of vineyard management practices. **Journal of Food Bioactives**, v. 9, p. 170-178, 2020.
- CZABAJ, S.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A.; KLIKS, J. Effects of Mead Wort Heat Treatment on the Mead Fermentation Process and Antioxidant Activity. **Molecules**, 22(5), 803, 2017.
- COSTA, R.R.; RODRIGUES, A.A.M.; VASCONCELOS, V.A.F.; COSTA, J.P.D.; LIMA, M.A.C. Trellis systems, rootstocks and season influence on the phenolic composition of ‘Chenin Blanc’ grape. **Sci. Agric.** v.77, n.3, e20180207, 2020.
- DOBROWOLSKA-IWANEK, J. Simple method for determination of short-chain organic acid in mead. **Food Analytical Methods**, 8(9), 2356–2359, 2015.
- FREIRE, K.R.L.; LINS, A.C.S.; DÓREA, M.C. SANTOS, F.A.R.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, 17(2), 1652–1664, 2012.
- GOMES, T.; DIAS, T.; CADAVEZ, V.; VERDIAL, J.; MORAIS, J.S.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L.M. Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. **Polish Journal of Food Nutrition Sciences**, 65, 137-142, 2015.
- HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, 173, 501–513, 2015.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2018**. Rio de Janeiro, vol 46, p.1-8, 2018.
- IGLESIAS, A.; PASCOAL, A.; CHOUPINA, A.B.; CARVALHO, C.A.; FEÁS, X., ESTEVINHO, L.M. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 12577–12590, 2014.

KAWA-RYGIELSKA, J.; ADAMENKO, K.; KUCHARSKA, A. Z.; SZATKOWSKA, K. Fruit and herbal meads – Chemical composition and antioxidant properties. **Food Chemistry**, 283, 19–27, 2019.

KORIEM, K.M.M. Caftaric acid: an overview on its structure, daily consumption, bioavailability and pharmacological effects. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, vol 10, n.3, 2020.

KOSTIĆ, A.; MILINČIĆ, D.D.; GAŠIĆ, U.M.; NEDIĆ, N.; STANOJEVIĆ, S.P.; TEŠIĆ, Ž.L.; PEŠIĆ, M.B. Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant. **LWT - Food Science and Technology**, 112, 2019.

KAHOUN, D.; ŘEZKOVÁ, S.; VEŠKRNOVÁ, K.; KRÁLOVSKÝ, J.; HOLČAPEK, M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. **Journal of Chromatography A**, 1202(1), 19–33, 2008.

LI, R.; SUN, Y. 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.

LIMA, M.D.S.; SILANI, I.D.S.V.; TOALDO, I.M.; CORRÊA, L.C.; BIASOTO, A.C.T.; PEREIRA, G.E.; BORDIGNON-LUIZ, M.T.; NINOW, J.L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, 161, 94–103, 2014.

LUKIĆ, I.; RADEKAA, S.; BUDIĆ-LETOC, I.; BUBOLAA, M.; VRHOVSEKD, U. Targeted UPLC-QqQ-MS/MS profiling of phenolic compounds for differentiation of monovarietal wines and corroboration of particular varietal typicity concepts. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 300, 2019.

MARTÍN, J.J.D.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; DIAZ-ROMERO, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Phenolic profile in varietal White wines made in the Canary Islands. **European Food Resesearch and Technology**, v. 226, n. 4, p. 871-876, 2008.

MENDES-FERREIRA, A.F.; COSME, A.C.; BARBOSA, A.V.; FALCO, B.A.; INÊS, A.; MENDES-FAIA, A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production, **Int. J. Food Microbiol.** 144, 193–198, 2010.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 426–428, 1959.

MOTILVA, M.J.; MACIÀ, A.; ROMERO, M.P.; RUBIÓ, L.; MERCADER, M.; GONZÁLEZ-FERRERO, C. Human bioavailability and metabolism of phenolic compounds from red wine enriched with free or nano-encapsulated phenolic extract. **J. Funct. Foods**, 25, 80–93, 2016.

NASCIMENTO, K.S.; SATTLER, J.A.G.; MACEDO, L.F.L.; GONZÁLEZ, C.V.S.; MELO, I.L. P.; ARAÚJO, E. S.; GRANATO, D.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **LWT- Food Science and Technology**, 91, 85–94, 2018.

NATIVIDADE, M.M.P.; CORRÊA, L.C.; SOUZA, S.V.C.; PEREIRA, G.E.; LIMA, L.C.O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, 110, 665–674, 2013.

OIV – Organisation International De La Vigne e Du Vin. **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis**. Vol.2, 2019.

OIV – Organisation International De La Vigne e Du Vin. **Oenological Practices: Maximum acceptable limits**, 2015.

OTTAVIANI, J.I.; MOMMA, T.Y.; HEISS, C.; KWIK-URIBE, C.; SCHROETER, H.; KEEN, C.L. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, 50, pp. 237-244, 2011.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J.C.; CÂMARA, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, 105, 204–214, 2007.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, 101, 2010.

PEREIRA, A.P.; MENDES-FERREIRA, A.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIAL, A. Improvement of mead fermentation by honey-must supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 405–410, 2015.

PEREIRA, A.P.; DIAS, T.; ANDRADE, J.; RAMALHOSA, E.; ESTEVINHO, L.M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, 47(8), 2057–2063, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9-10), 1231–1237, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology: The chemistry of wine, stabilization and treatments** Vol. 2. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2006.

ROLDÁN, A.; VAN MUISWINKEL, G.C.J.; LASANTA, C.; PALACIOS, V.; CARO, I. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, 126(2), 574–582, 2011.

SALMON, J.M.; VUCHOT, P.; DOCO, T.; Moutounet, M. Maintenance and protection of yeast morphology by contact with wine polyphenols during simulation of wine aging on lees. **Journal of Food Science**, 68, 1782–1787, 2010.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, 18, 820–897, 2015.

SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, 196, 309–323, 2016.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144–158, 1965.

SOCHA, R.; PAJAŁ, P.; FORTUNA, T.; BUKSA, K. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Polish Meads. **International Journal of Food Properties**, 18(12), 2713–2725, 2015.

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

SROKA, P.; TUSZYŃSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 1250–1257, 2007.

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**, 2020.

ŠVECOVÁ, B.; BORDOVSKÁ, M.; KALVACHOVÁ, D.; HÁJEK, T. Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. **Journal of Food Composition and Analysis**, 38, 80–88, 2015.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19(6–7), 669–675, 2006.

VIDRIH, R.; HRIBAR, J. Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. **Acta Alimentaria**, 36, 151–162, 2007.

WANG, X.H.; GHELDOLF, N.; ENGESETH, N.J. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. **J. Food Sci.**, 69, 96–101, 2004.

WINTERSTEEN, C.L.; ANDRAE, L.M.; ENGESETH, N. J. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead, **J. Food Sci.** 70(2), 119–126, 2005. ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F. S. **Wine analysis and production.** Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 1999.

ZULUAGA, C.; MARTÍNEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-BALDÓ, J.; QUILES, A.; RODRIGO, D. Effect of high pressure processing on carotenoid and phenolic compounds, antioxidant capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 37, 10–17, 2016.

CONCLUSÕES GERAIS

A diversificação de gêneros baseados nos produtos apícolas mostra-se necessária para o fortalecimento da cadeia produtiva apícola na região nordeste através do desenvolvimento de estratégias para explorar o mercado interno, sendo a produção de hidromel uma opção promissora.

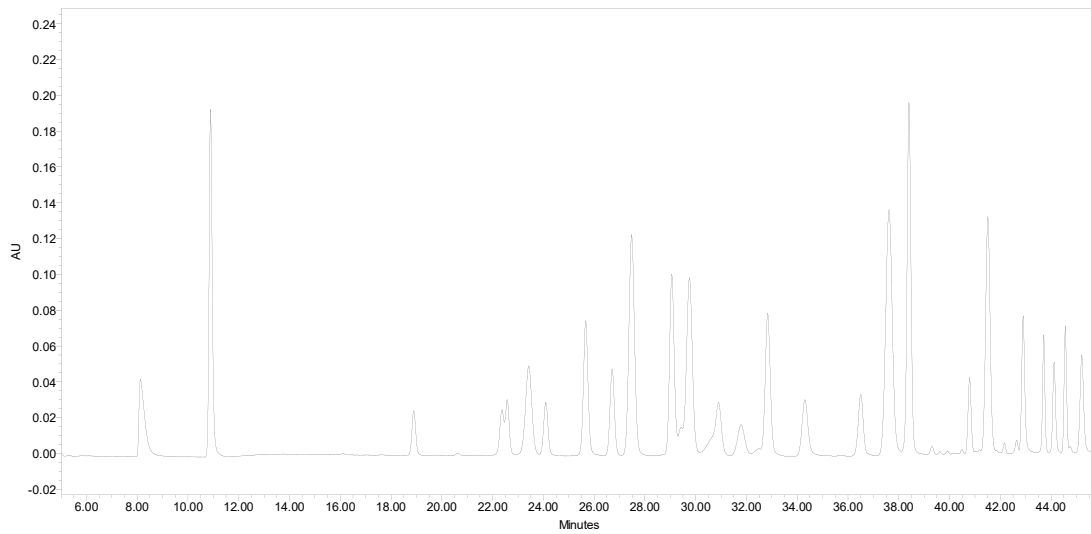
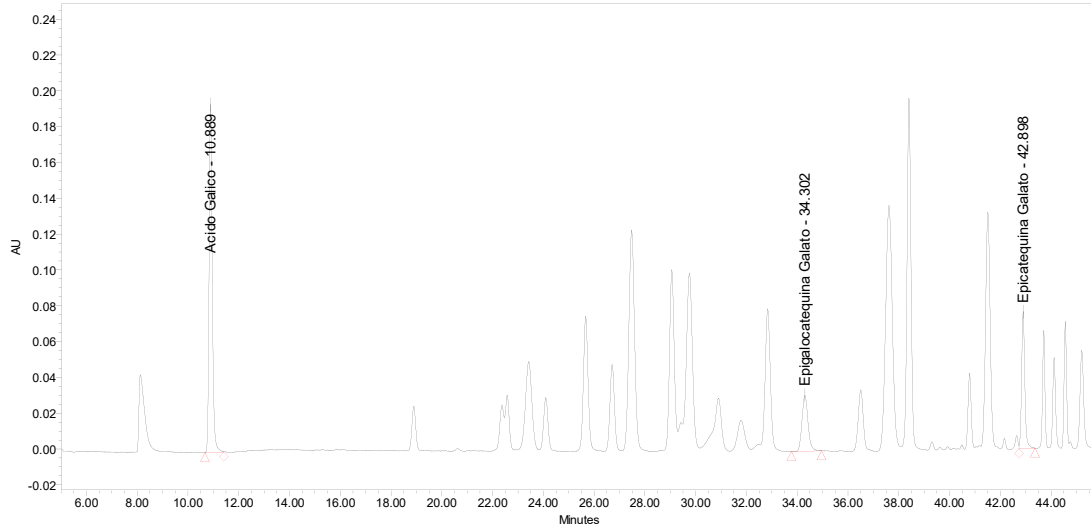
O mel e o pólen apresentam potencial para serem utilizados no processamento de bebidas, visto que a produção de hidromel mostrou-se tecnologicamente viável. A composição físico-química atendeu aos limites estabelecidos pela legislação brasileira para hidromel, classificando-o como uma bebida alcoólica suave. O perfil da composição fenólica demonstrou que os produtos obtidos apresentaram grande variedade de compostos bioativos, sendo detectados 17 compostos fenólicos. Concluiu-se, através dos parâmetros avaliados, que o hidromel se assemelha ao vinho branco, apresentando-se como uma opção de investimento na área de bebidas para o semiárido nordestino, além de representar uma forma de agregar valor aos produtos apícolas.

ANEXOS

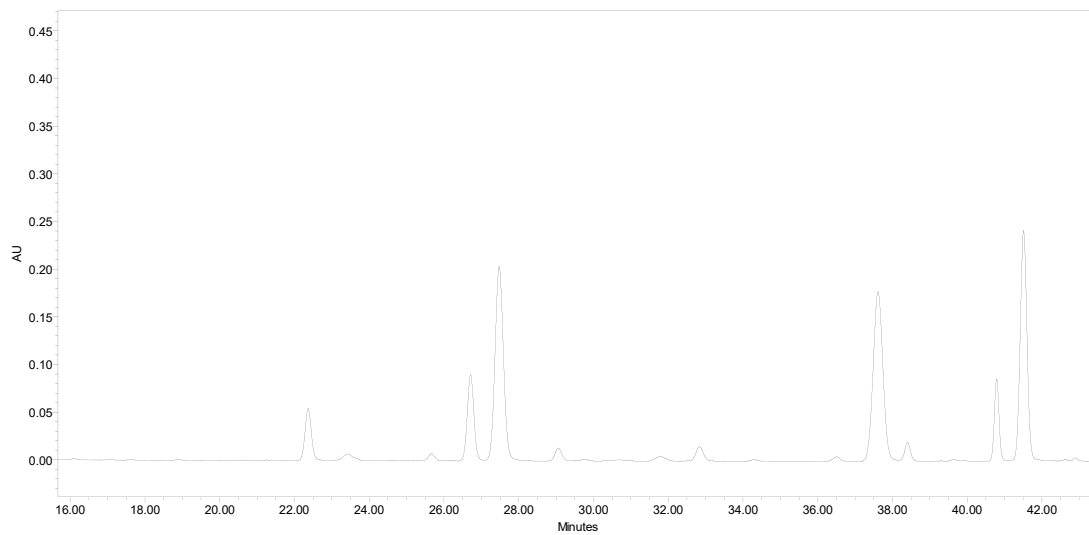
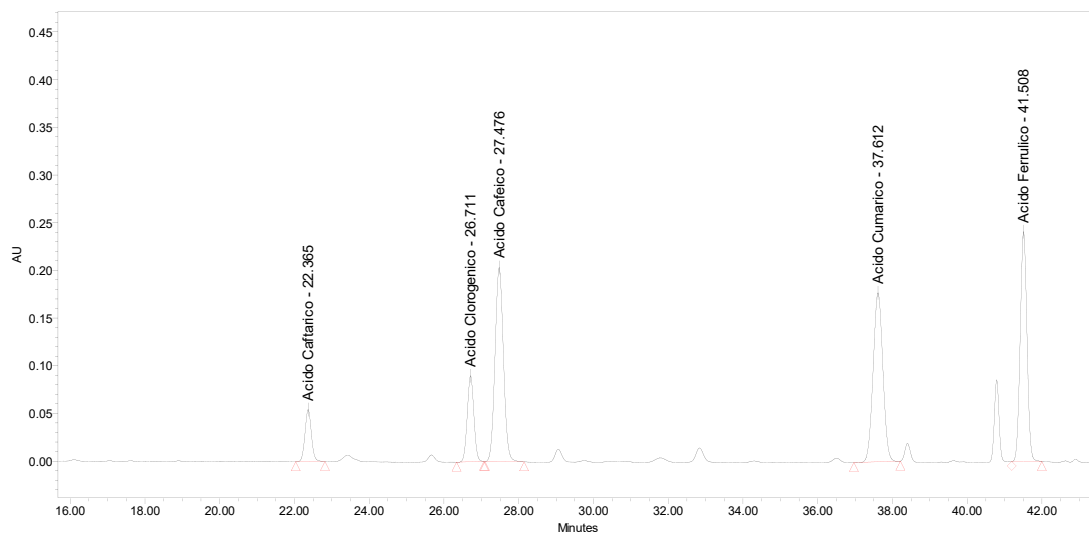
ANEXO A - AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO MEL

	Embrapa Meio-Norte Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Apícolas Av. Duque de Caxias, 5650, Buenos Aires. C. Postal 01 Fone: (86) 3198-0563 FAX (86) 3198-0530 Teresina - PI		
RELATÓRIO DE ENSAIO ANALÍTICO			
N.º: 178/2019 Teresina, 18 de setembro de 2019			
Requisitante: Dra. Aline Teles Blasoto Endereço: Embrapa Semiárido Zona Rural Petrolina-PE Identificação da Amostra Número: 178/2019 Produto: Mel Localidade: - Cidade: Petrolina - PE Responsável: Fabia de Mello Pereira Lote: Florada: Apis Data de entrega no Laboratório: 03/09/2019 Data de Coleta: agosto/2019			
ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS			
ENSAIOS	RESULTADOS	PARÂMETROS	REFERÊNCIA
Açúcares Redutores	73,29	Mínimo 65g/100g	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.1
Umidade	15,34	Máximo 20g/100g	A.O.A.C.16 th Edition, Rev.4 th , 1998-969.38B
Sacarose aparente	3,21	Máximo 6g/100g	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.2
Sólidos Ins. em água	0,03	Máximo 0,1g/100g	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.4
Minerais (cinzas)	0,46	Máximo 0,6g/100g	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.5
Acidez	25,96	Máximo 50Meq/kg	A.O.A.C.16 th Edition, Rev.4 th , 1998-962.19
Atividade Diastásica	25,87	Mínimo 8 esc. Göthe	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.7
Hidroximetilfurfural (HMF)	13,82	Máximo 60mg/kg	A.O.A.C.16 th Edition, Rev.4 th , 1998-980.23
Brix	82,85	-	A.O.A.C.16 th Edition, Rev.4 th , 1998-969.38B
Cor	Ambar	-	
Absorbância	0,499	-	Brasil, Ministério da Agricultura, 1981
HMF: <input checked="" type="checkbox"/> CARREZ <input type="checkbox"/> CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COR: <input checked="" type="checkbox"/> ESPECTROFOTOMÉTRICO <input type="checkbox"/> COLORIMÉTRICO			
ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS			
ENSAIOS	RESULTADOS (UFC/mL)	PARÂMETROS	REFERÊNCIA
Bolores e Leveduras	43	100 ufc/ml	AP.H.A., 2nd. Ed. 1984
Coliformes a 35°C	0 ufc/ml	0 ufc/ml	AP.H.A., 2nd. Ed. 1984
Coliformes a 45°C	0 ufc/ml	0 ufc/ml	AP.H.A., 2nd. Ed. 1984
Salmonella spp.	-	0 ufc/ml	AP.H.A., 2nd. Ed. 1984
OBSERVAÇÕES: 1 - A coleta e o transporte da amostra é de responsabilidade do requisitante. 2 - Estes resultados referem-se apenas a amostra analisada. 3 - Méis com baixo conteúdo enzimático devem ter como mínimo uma atividade diastásica correspondente a 3 na escala de Göthe, sempre que o conteúdo de HMF não exceda 15 mg/Kg.			
CONCLUSÃO: A amostra apresenta-se em ACORDO com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, Inst. Normativa nº 11, de 20/10/2000, Publicada no DOU de 23/10/ 2000, seção I p. 16-17.			
 Ana Lúcia Horta Barreto Pesquisadora da Embrapa Meio Norte CRQ 18.200.048 18ª Região			
RQ 011	Rev00	01/03/06	

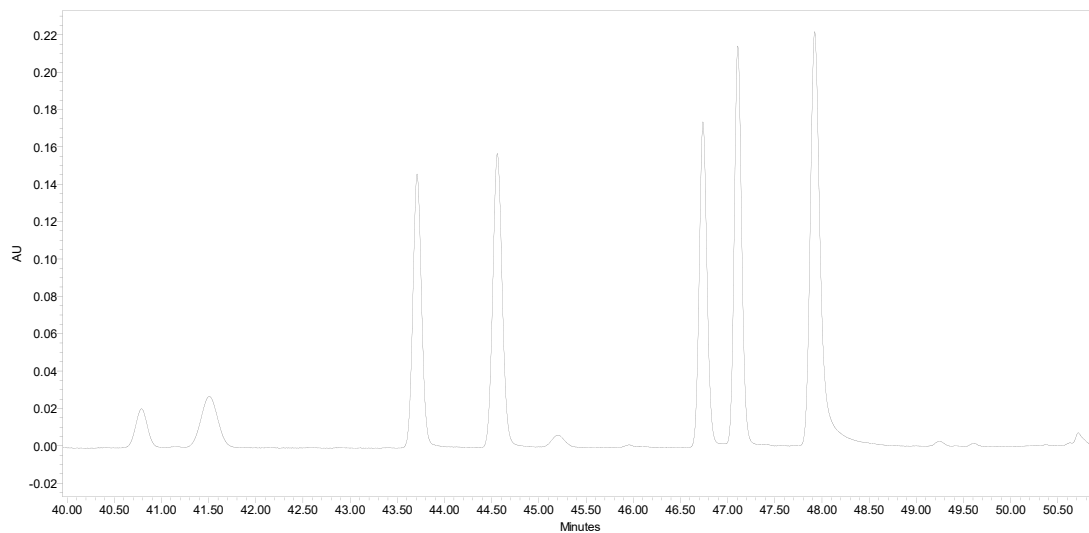
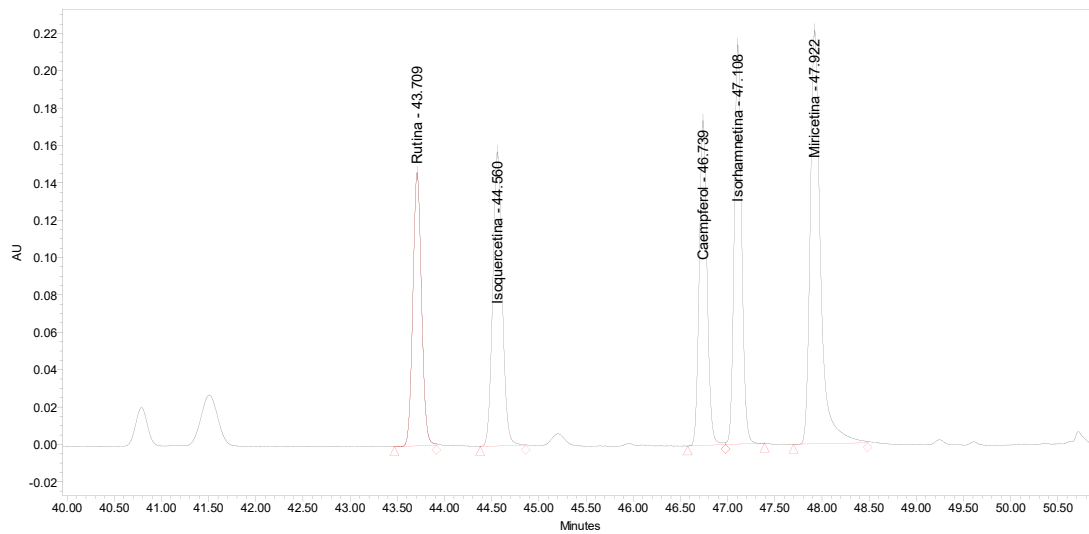
ANEXO B – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 280 NM



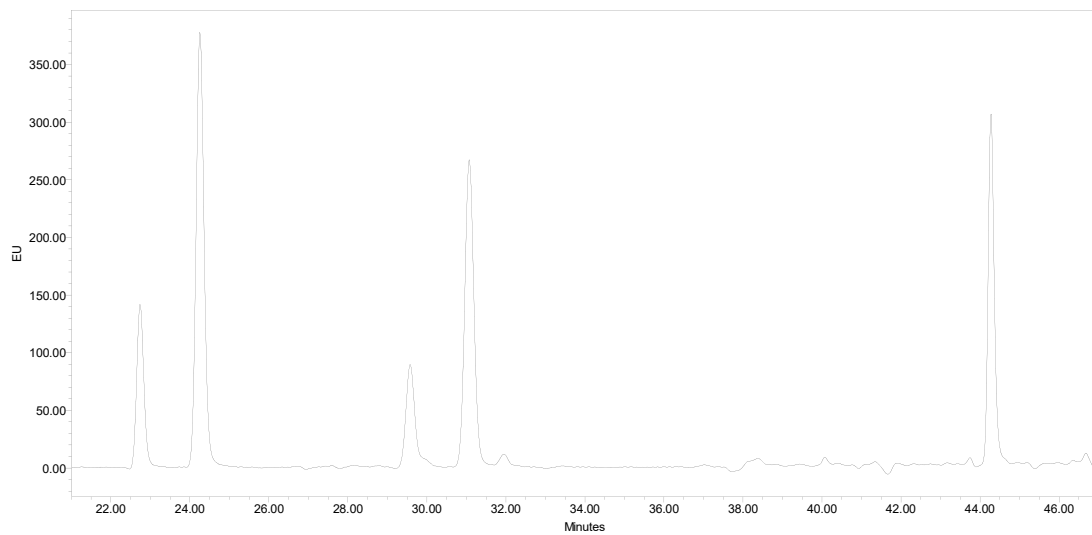
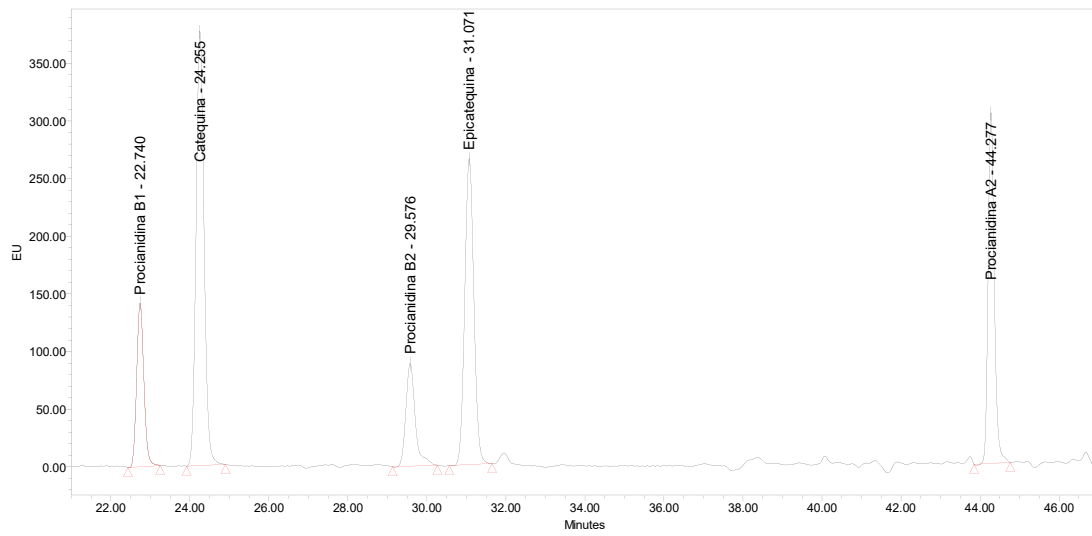
ANEXO C – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 320 NM



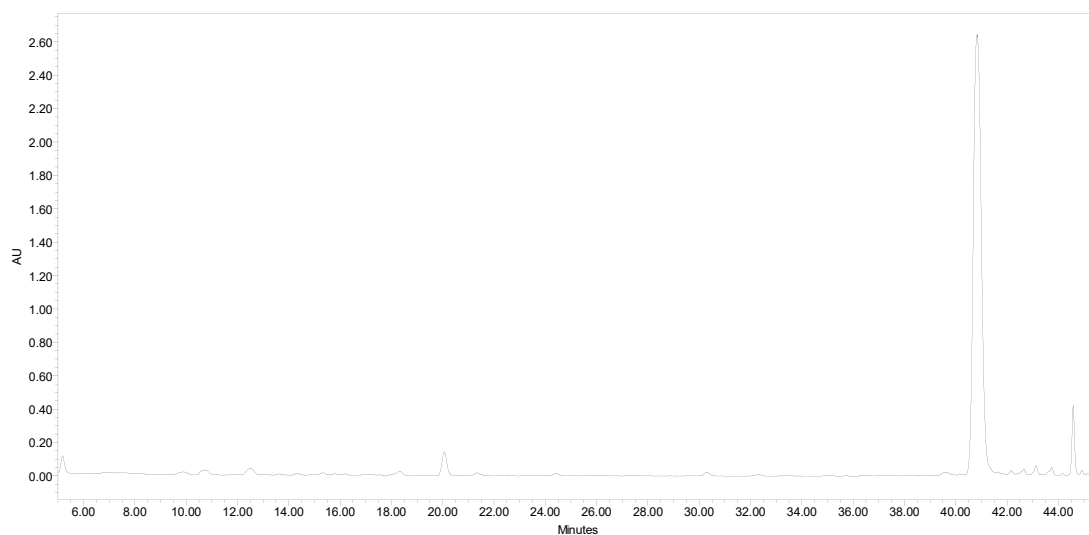
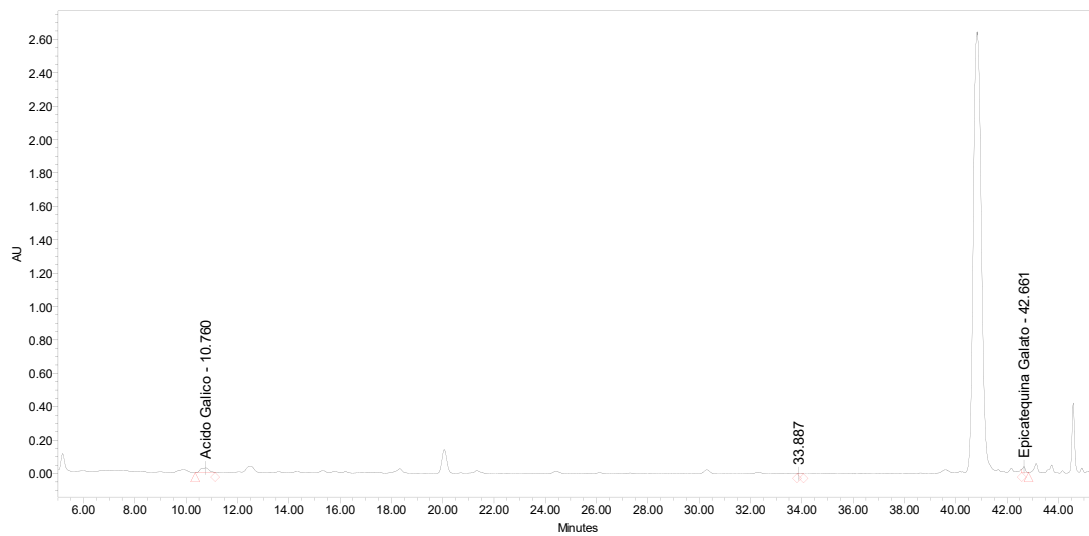
ANEXO D – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 360 NM



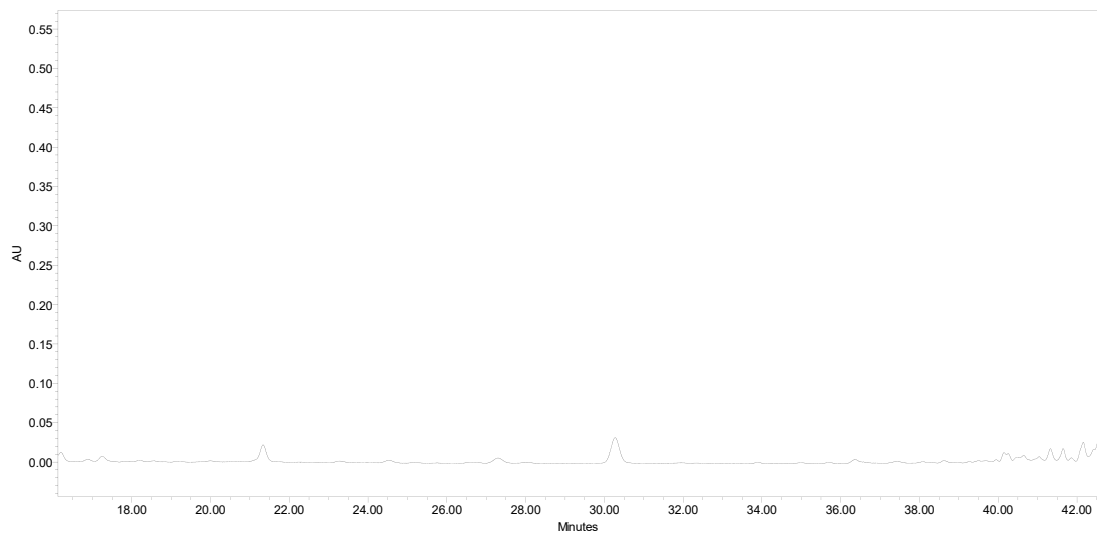
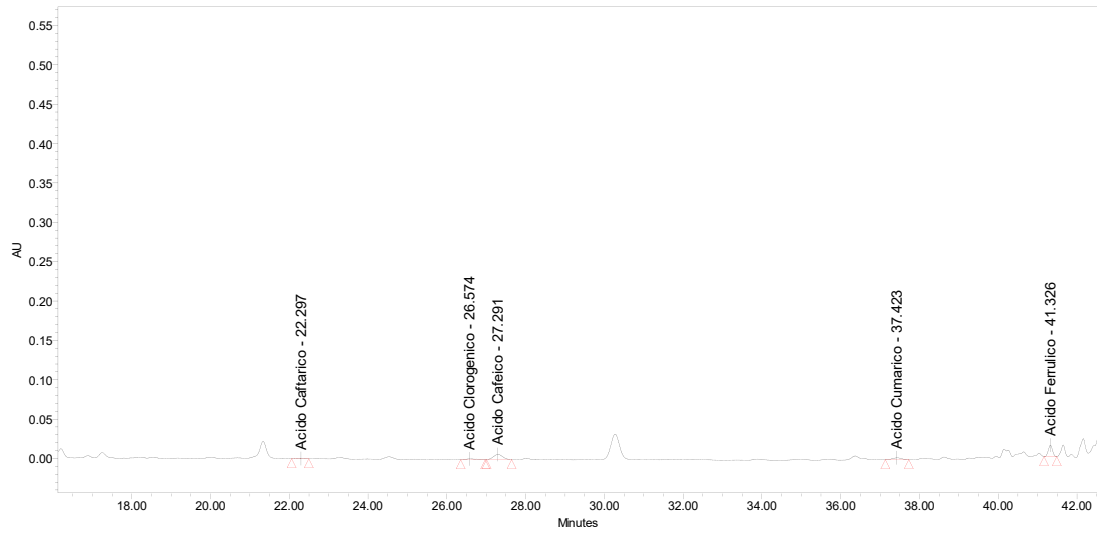
ANEXO E – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM 320 FLUOR



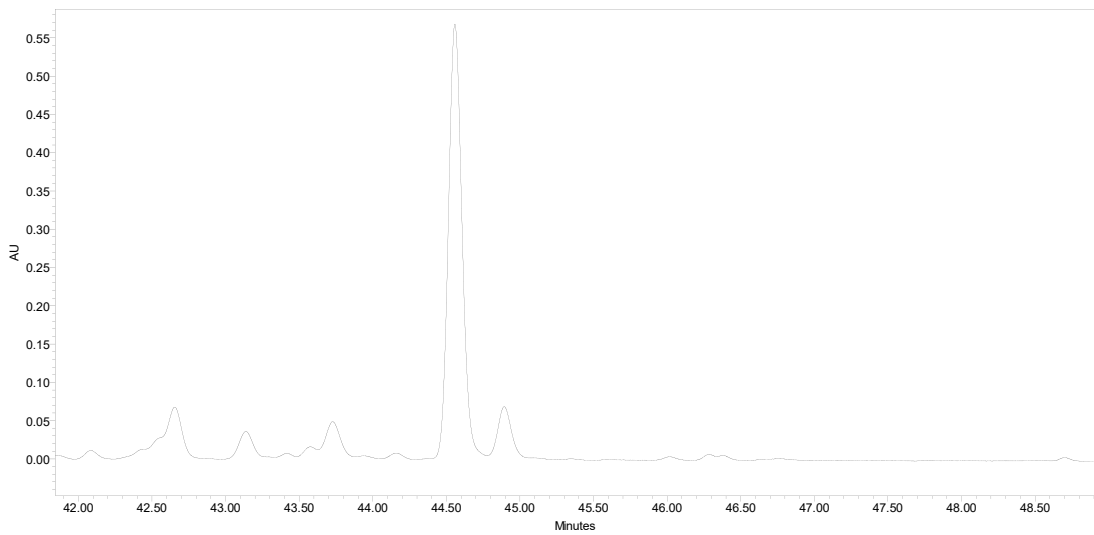
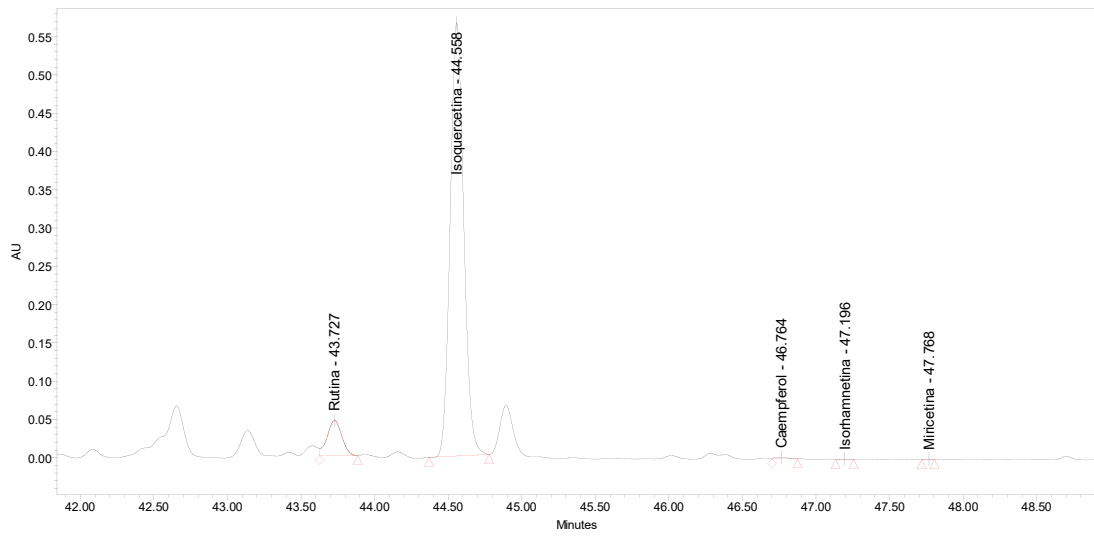
ANEXO F – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 280 NM



ANEXO G – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 320 NM



ANEXO H – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 360 NM



ANEXO I – CROMATOGRAMAS DA AMOSTRA H2R1 EM 320 FLUOR

