



ALBERTO LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL
UTILIZANDO A BORRA E RESÍDUOS DO CAFÉ
PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**

**LAVRAS – MG
NOVEMBRO, 2020**

ALBERTO LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO A BORRA
E RESÍDUOS DO CAFÉ PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Carlos José Pimenta.

Orientador

Prof. Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes.

Coorientador

LAVRAS – MG

NOVEMBRO, 2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Alberto Lima de.

Produção e caracterização de hidromel utilizando a borra e
resíduos do café processado por via úmida / Alberto Lima de
Oliveira. - 2020.

56 p. : il.

Orientador(a): José Carlos Pimenta.

Coorientador(a): Evandro Galvão Tavares Menezes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Hidromel. 2. Café. 3. Fermentação alcoólica. I. Pimenta, José
Carlos. II. Menezes, Evandro Galvão Tavares. III. Título.

ALBERTO LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL UTILIZANDO A BORRA
E RESÍDUOS DO CAFÉ PROCESSADO POR VIA ÚMIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 26 de novembro de 2020

Dr. Carlos José Pimenta UFLA

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes UFV

Prof. Dr. Carlos José Pimenta
Orientador

**LAVRAS – MG
NOVEMBRO, 2020**

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, pela oportunidade, força e proteção.

A meus pais, que deram todo apoio, força e incentivos necessários durante essa jornada e nunca descreditaram.

Ao meu irmão, um modelo de determinação e incentivo ao estudo.

À minha madrinha Vânia, pelas palavras de apoio e orações.

Se é verdade que por trás de todo grande homem há uma grande mulher, devo dizer que às vezes isso se aplica a homens comuns. Agradeço à minha companheira Lígia pelo incentivo, apoio e companheirismo.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa, em especial ao professor Dr. Carlos J. Pimenta, pela confiança e orientação.

Ao Prof. Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes, pela coorientação, apoio e conhecimentos.

Aos companheiros de pós-graduação que auxiliaram, não apenas na pesquisa desta dissertação, mas em todas atividades ao longo do curso de mestrado.

Agradeço à Capes pelo apoio financeiro.

“O esforço contínuo, não a força ou a inteligência, é a
chave para libertar todo o nosso potencial”

(Winston Churchill)

RESUMO

Contendo elevados teores de açúcares fermentescíveis e compostos fenólicos, a casca e polpa de café são resíduos gerados durante o processamento via úmida do café. Por ser o maior produtor mundial do grão, o Brasil gera toneladas de casca e polpa a cada ano. Além destes resíduos, a borra resultante do consumo de café tem sido alvo de estudos a fim de aproveitamento e melhor deposição ao ambiente. Dentre as formas de aproveitamento há destaque para processos fermentativos, como a produção de hidromel. O hidromel é uma bebida fermentada obtida pela diluição do mel em água, adicionando-se ou não nutrientes e inóculo selecionado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso da borra, casca e polpa de café na produção de hidromel. Um extrato da casca e polpa contendo 7 °BRIX foi obtido pelo processo de moagem, prensagem e filtração destes resíduos, sendo utilizado na diluição do mel. Outro tratamento foi realizado utilizando uma solução contendo 15% de borra. Para controle, utilizou-se o mel diluído em água destilada estéril. Testes de adulteração foram realizados no mel utilizado, obtendo-se resultados negativos para as reações de Fiehe, Lugol e reação de Lund. Como inóculo foram utilizadas as leveduras *S. Bayanus* Red Star Champagne e *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118. As fermentações foram iniciadas a 20 °BRIX, pH 5,0 e 10^8 células viáveis a uma temperatura de 20 °C para todo processo. A estabilização do consumo de açúcares redutores, pH e desprendimento de CO₂ ocorreu após 240 horas. A cinética da fermentação foi estudada, obtendo-se maiores valores de eficiência fermentativa (Ef), produtividade de etanol (Qp) e conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$) para os meios adicionados do extrato. A adição do extrato aumentou também a viabilidade celular durante a fermentação, sendo checada por Câmara de Neubauer utilizando a coloração por azul de metileno. A adição da borra de café aumentou a fase lag das leveduras possivelmente pela presença do HMF, sendo necessários um maior período para estabilização dos índices de açúcares redutores e pH. As bebidas foram caracterizadas quando a legislação vigente e dentre os parâmetros analisados apenas a acidez total ficou fora do padrão estabelecido, sendo o tratamento E Red o de maior acidez total (48,70 meq.L⁻¹). Os hidroméis foram caracterizados também quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. A cepa Red Star Champagne se destacou com produção de hidroméis com maiores teores alcoólicos e maiores valores de Ef, sendo o mosto fermentado por este levedo com adição do extrato o de maior graduação alcoólica (13,88%). De forma geral, as bebidas produzidas pela cepa EC 1118 apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Houve variação de fenólicos totais de 332,30 (E Lalvin) a 268,33 EAG.L⁻¹ (C Red). O tratamento E Lalvin apresentou também maior atividade antioxidante, sendo de 2,50 TEAC mM.L⁻¹ (ABTS) e 2,71 TEAC mM.L⁻¹ (DPPH). Fica evidente o potencial do extrato da casca e polpa de café cereja na produção de hidromel, uma vez que a adição do extrato ao mosto resultou em bebidas com maiores teores alcoólicos, maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

ABSTRACT

Containing high levels of fermentable sugars and phenolic compounds, the coffee husk and pulp are residues generated during the wet processing of coffee. As the world's largest coffee producer, Brazil generates tons of husk and pulp each year. In addition to these residues, the sludge resulting from the consumption of coffee has been the subject of studies in order to recycling it and how to better deposit it in the environment. Among the recycling forms, fermentative processes stand out, such as the production of mead. Mead is a fermented beverage obtained by diluting honey in water, with or without addition of nutrients and selected inoculum. The objective of this work was to evaluate the feasibility of using coffee sludge, husk and pulp in the production of mead. An extract of the husk and pulp containing 7 °BRIX was obtained by crushing, pressing and filtering these residues, being used in the dilution of honey. Another treatment was carried out with a solution containing 15% sludge. For the control, honey diluted in sterile distilled water was used. Adulteration tests were performed on the honey used, obtaining negative results for Fiehe, Lugol and Lund's reaction. The yeast *S. Bayanus* Red Star Champagne and *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118 were used as inoculum. Fermentations were started at 20 °BRIX, pH 5.0 and 10^8 viable cells at a temperature of 20 °C for the entire process. The stabilization of the consumption of reducing sugars, pH and CO₂ release occurred after 240 hours. Fermentative kinetics was studied, obtaining higher values of fermentative efficiency (Fe), ethanol productivity (Q_p) and conversion of the substrate into ethanol (Y_{p/s}) for the medium added to the extract. The addition of the extract also increased cell viability during fermentation, being verified by a Neubauer Chamber with methylene blue reagent. The addition of coffee sludge increased the lag phase of the yeasts possibly due to presence of HMF, requiring a longer period to stabilize the levels of reducing sugars and pH. Meads were characterized as current legislation and among the parameters analyzed only the total acidity was outside the established standard, with the E Red treatment being the highest total acidity (48.70 meq.L⁻¹). Meads were also characterized as content of phenolic compounds and antioxidant activity by the DPPH and ABTS methods. The Red Star Champagne strain stood out for the production of mead with higher alcohol levels and higher Fe values, which medium fermented by this yeast with the addition of the extract had higher alcohol content (13.88%). In general, the beverages produced by the EC 1118 strain showed higher levels of phenolic compounds and antioxidant activity. There was a variation in total phenolics from 332.30 (E Lalvin) to 268.33 GAE.L⁻¹ (C Red). The E Lalvin treatment also showed greater antioxidant activity, with 2.50 TEAC mM.L⁻¹ (ABTS) and 2.71 TEAC mM.L⁻¹ (DPPH). The potential of husk and pulp extract in the production of mead is evident, since the addition of the extract to the wort resulted in drinks with higher alcohol content, higher concentration of phenolic compounds and antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CAMADAS DO FRUTO DE CAFÉ.	13
FIGURA 2: FOTOS DOS FRUTOS DE CAFÉ.	14
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DO CAFÉ.	15
FIGURA 4: ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS.	23
FIGURA 5: CONSUMO DE ART AO LONGO DA FERMENTAÇÃO, SENDO A FIGURA A REPRESENTANDO A LEVEDURA LALVIN EC 1118 E B PARA O CONSUMO DA RED STAR CHAMPAGNE.	37
FIGURA 6: VARIAÇÃO DE PH AO LONGO DO PROCESSO FERMENTATIVO, SENDO A FIGURA A REPRESENTANDO A LEVEDURA LALVIN EC 1118 E B PARA RED STAR CHAMPAGNE.	39
FIGURA 7: CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA ANÁLISE DE CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.	55
FIGURA 8: CURVA PADRÃO TROLOX PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO RADICAL DPPH.	55
FIGURA 9: CURVA PADRÃO TROLOX PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO RADICAL ABTS ^{·+}	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CAFÉ TOTAL (ARÁBICA E CONILON) - COMPARATIVO DE ÁREA EM PRODUÇÃO, PRODUTIVIDADE E PRODUÇÃO ENTRE AS REGIÕES BRASILEIRAS PARA O ANO DE 2018.	12
TABELA 2: TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, ÁCIDO CLOROGÊNICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH DA CASCA, POLPA E BORRA DE CAFÉ.	17
TABELA 3: TEORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DE POLIFENÓIS, AÇÚCAR TOTAL E AÇÚCAR REDUTOR NA POLPA DE CAFÉ E EXTRATOS DE POLPA DE CAFÉ, EM BASE ÚMIDA.	18
TABELA 4: COMPOSIÇÃO DO MEL DE DIFERENTES ORIGENS FLORAIS.	19
TABELA 5: FERMENTAÇÕES REALIZADAS COM AS RESPECTIVAS COMPOSIÇÕES DO MOSTO E LEVEDURAS EMPREGADAS.	29
TABELA 6: TESTES DE ADULTERAÇÃO DO MEL UTILIZADO PARA FERMENTAÇÃO.	34
TABELA 7: CARACTERIZAÇÃO DO MEL UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DO HIDROMEL.	35
TABELA 8: CARACTERIZAÇÃO DA BORRA E EXTRATO DA CASCA E POLPA DO CAFÉ CEREJA.	36
TABELA 9: CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS EM CÂMARA DE NEUBAUER NAS FERMENTAÇÕES ESTUDADAS, SENDO OS RESULTADOS EXPRESSOS EM 10^8 CÉLULAS / mL.	41
TABELA 10: PRODUTIVIDADE EM ETANOL (QP TEOR PRODUZIDO DE ETANOL EM 240 HORAS DE FERMENTAÇÃO), EFICIÊNCIA FERMENTATIVA (Ef %), CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS ($Y_{x/s}$ GRAMAS DE CÉLULAS PRODUZIDAS POR GRAMA DE ART CONSUMIDO) E CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM ETANOL ($Y_{p/s}$ GRAMAS DE ETANOL PRODUZIDO POR GRAMAS DE ART CONSUMIDOS).	42
TABELA 11: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROMÉIS.	43

TABELA 12: FENÓLICOS TOTAIS (FT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS ABTS E DPPH.....	44
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Mercado cafeeiro	11
2.2 Café	12
2.2.1 Processamento do café	14
2.2.2 Resíduos	16
2.3 Mel	18
2.4 Hidromel	19
2.4.1 Compostos voláteis	21
2.5 Fermentação Alcoólica	22
2.6 Levedura selecionada	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Matéria prima	24
3.2 Obtenção do extrato da polpa e casca de café	25
3.3 Análises das matérias primas	25
3.3.1 Extrato da casca e polpa de café cereja	25
3.3.2 Mel	26
3.3.3 Borra	27
3.4 Fermentação	28
3.4.1 Preparo do inóculo	28
3.4.2 Planejamento experimental	28
3.4.3 Fermentação do mosto	29
3.4.4 Análises do processo fermentativo	29
3.5 Caracterização do hidromel	32
3.5.1 Teor alcoólico	32
3.5.2 Atividade antioxidante total pelo método de DPPH	32
3.5.3 Atividade antioxidante total pelo método de ABTS ^{·+}	33
3.6 Análise estatística	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Caracterização das matérias primas	34
4.1.1 Mel	34
4.1.2 Borra e extrato da casca e polpa de café cereja	35
4.2 Processo fermentativo	36
4.2.1 Açúcares redutores totais	36
4.2.2 pH	38
4.2.3 Viabilidade celular e contagem de células em Câmara de Newbauer	40
4.2.4 Parâmetros fermentativos	41
4.3 Caracterização dos hidroméis	42
5 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser o maior produtor e exportador mundial de café, o Brasil é o segundo maior consumidor, sendo o consumo anual calculado em aproximadamente 21 milhões de sacas de 60 kg (ABIC, 2019).

Como resultado do alto consumo, o país gera grande quantidade de borra de café, oriunda do preparo da bebida, seja em residências ou estabelecimentos comerciais. A maioria da borra é destinada ao lixo e, quando aproveitada, tem sido utilizada principalmente em processos de compostagem.

No processamento do café podem ser empregados os processos por via seca ou via úmida. Na via seca o café é processado intacto, sendo os frutos secos com a casca e originando o café em coco. Já na via úmida a casca e polpa são retiradas antes da secagem, podendo a mucilagem ser retirada ou não (ZHANG et al., 2019).

O processamento via úmida do café dá origem a elevado volume de resíduos, os quais tem sido alvo de estudos visando seu reaproveitamento como forma de evitar seu despejo inadequado no meio ambiente. Para o Brasil, a questão dos resíduos da agroindústria cafeeira é ainda mais grave, visto sua alta produção. Dentre os resíduos, a casca e polpa do café destacam-se.

Pelo processamento úmido aproximadamente uma tonelada de massa contendo a casca, polpa e mucilagem é gerada para cada tonelada de café seco produzido. A polpa é separada do grão durante o processamento úmido, e corresponde a cerca de 40% em peso (SAENGER et al., 2001).

Tanto a casca quanto a polpa são ricos em nutrientes e compostos orgânicos, como açúcares fermentescíveis, aminoácidos e ácidos orgânicos. A polpa resultante do processamento via úmida do café contém cerca de 23 a 27% de açúcares fermentescíveis, com base no peso seco. Os resíduos apresentam também cafeína, taninos e polifenóis (MARTINEZ et al., 2019; NAYAK e HARSHITHA, 2012).

Apesar de sua riqueza e grande potencial, estes resíduos ainda possuem pouca exploração econômica e aplicação tecnológica. Dentre as maneiras de reaproveitamento, há destaque para fermentação da casca e polpa para obtenção de bebidas fermento-destiladas e biocombustível. Compostos como cafeína e ácido clorogênico também tem sido estudados quanto a seus processos de extração, isolamento e aplicação (WOLDESENBET,

WOLDEYES e CHANDRAVANSI, 2016; MENEZES et al., 2013).

O hidromel, uma bebida fermentada a base de mel, vem ganhando destaque nos últimos anos. Pesquisas como condições de pH e temperatura de fermentação, cepas de leveduras utilizadas, meios de diluição e maturação da bebida ganham cada vez mais espaço no meio acadêmico e entre produtores da bebida (AMORIM, 2018; MILESKI, 2016).

O presente trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade técnica da produção de hidromel utilizando-se borra e extrato obtido da casca e polpa residuais do processamento via úmida do café e diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces*, assim como a caracterização das bebidas quanto à legislação vigente, avaliando a diferença entre as bebidas produzidas

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mercado cafeeiro

Dentre os produtos agrícolas do Brasil, o café é tido como um dos mais relevantes. De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a safra brasileira do ano de 2018 superou 61 milhões de sacas beneficiadas, sendo a maior colheita registrada na história.

Das mais de 61 milhões de sacas beneficiadas, a região sudeste corresponde a uma produção pouco superior a 53 milhões de sacas (Tabela 1). Há destaque para o estado de Minas Gerais, que produziu mais de 33 milhões de sacas, sendo em sua maioria de café arábica. O estado é também o que possui maior área de cafezal em produção e formação.

Em 2018, a área total que engloba os cafezais em produção e formação no país reduziu em 2,2% com relação à safra anterior. O aumento na produção se deve às condições climáticas favoráveis e ao crescente investimento em tecnologias por parte dos produtores. Como resultado, tem-se maior produção por hectare plantado (CONAB, 2019).

Tabela 1: Café total (arábica e conilon) - Comparativo de área em produção, produtividade e produção entre as regiões brasileiras para o ano de 2018.

REGIÃO	Área em produção (ha)	Produtividade (sacas 60kg / ha)	Produção (mil sacas)
Norte	63.879,0	30,97	1.978,3
Nordeste	130.000,0	35,00	4.550,2
Centro – Oeste	15.215,0	19,69	299,6
Sudeste	1.611.132,0	33,36	53.747,7
Sul	37.500,0	26,67	1.000,0
Norte / Nordeste	193.879,0	33,67	6.528,5
Centro – Sul	1.663.847,0	33,08	55.047,3
Brasil	1.864.322,8	33,07	61.657,5

Fonte: CONAB, 2019.

De acordo com a ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café, 2019), no ano de 2018 o consumo de café no Brasil aumentou em torno de 4,80% com relação ao ano anterior. Os dados obtidos com a nova pesquisa demonstram consumo per capita anual de 6,02 kg de café cru, com estimativa de crescente consumo nos próximos anos. A pesquisa demonstra ainda que o consumidor brasileiro está cada vez mais exigente com a qualidade da bebida, uma vez que possui maior conhecimento dos atributos positivos e negativos dos cafés. Muitos apreciadores da bebida buscam regiões produtoras específicas em decorrência da maior divulgação dos resultados de concursos de qualidade.

2.2 Café

A planta do cafeeiro pertence ao gênero *Coffea*, da família Rubiaceae, com diversas espécies em todo o mundo. Dentre as espécies com maior exploração econômica, destacam-se as *Coffea arabica* e *Coffea canephora* Pierre.

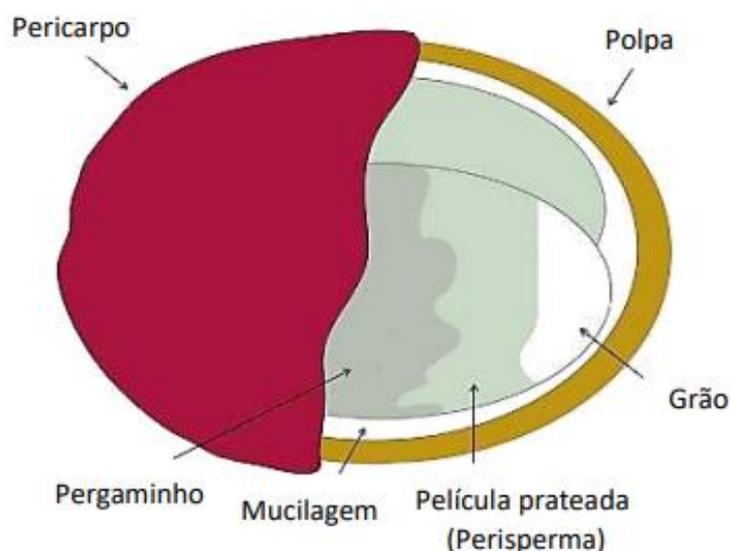
No Brasil, após a expansão da cafeicultura pelo mundo, surgiram algumas combinações genéticas entre hibridações naturais e cultivares existentes. Derivadas da variedade arábica, estão o Amarelo de Botucatu e o Maragogipe Vermelho, surgindo ainda

o Bourbon Amarelo, o Bourbon Vermelho, o Mundo Novo, o Caturra Vermelho e o Caturra Amarelo, derivados da variedade *Bourbon* (CARVALHO, 2007).

A variedade arábica resulta em bebida com mais características aromáticas, maior acidez e menos incorporada, apresentando maior concentração de sacarose, o que confere maior intensidade do atributo doce à bebida. O *Coffea arabica* apresenta também cafeína e compostos antioxidantes, como os ácidos clorogênicos, porém em menores concentrações quando comparado ao *Coffea conephora* (PERROIS et al., 2014; WINTGENS, 2009).

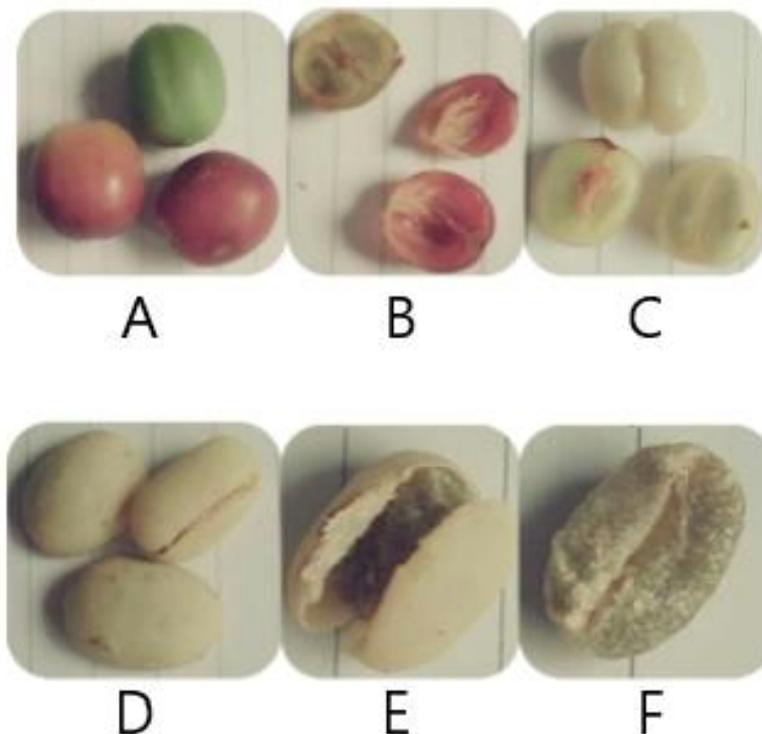
O café cereja, conhecido também como baga, é o fruto do cafeeiro. Conforme as Figuras 1 e 2, o fruto é composto pelo grão (o), coberto pela película prateada (perisperma) e pelo pergaminho, um endocarpo mais fino de cor amarelada. Acima do endocarpo, tem-se a mucilagem, com característica viscosa e alto teor de umidade. Acima da mucilagem encontra-se a polpa, que é fibrosa, doce e possui também coloração amarelada. Revestindo toda essa estrutura, encontra-se o pericarpo, uma casca exterior lisa e resistente, com coloração verde para os frutos não maduros e vermelha ou amarela para os frutos maduros (DURÁN et al., 2017; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012).

Figura 1: Camadas do fruto de café.



Fonte: ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012.

Figura 2: Fotos dos frutos de café.



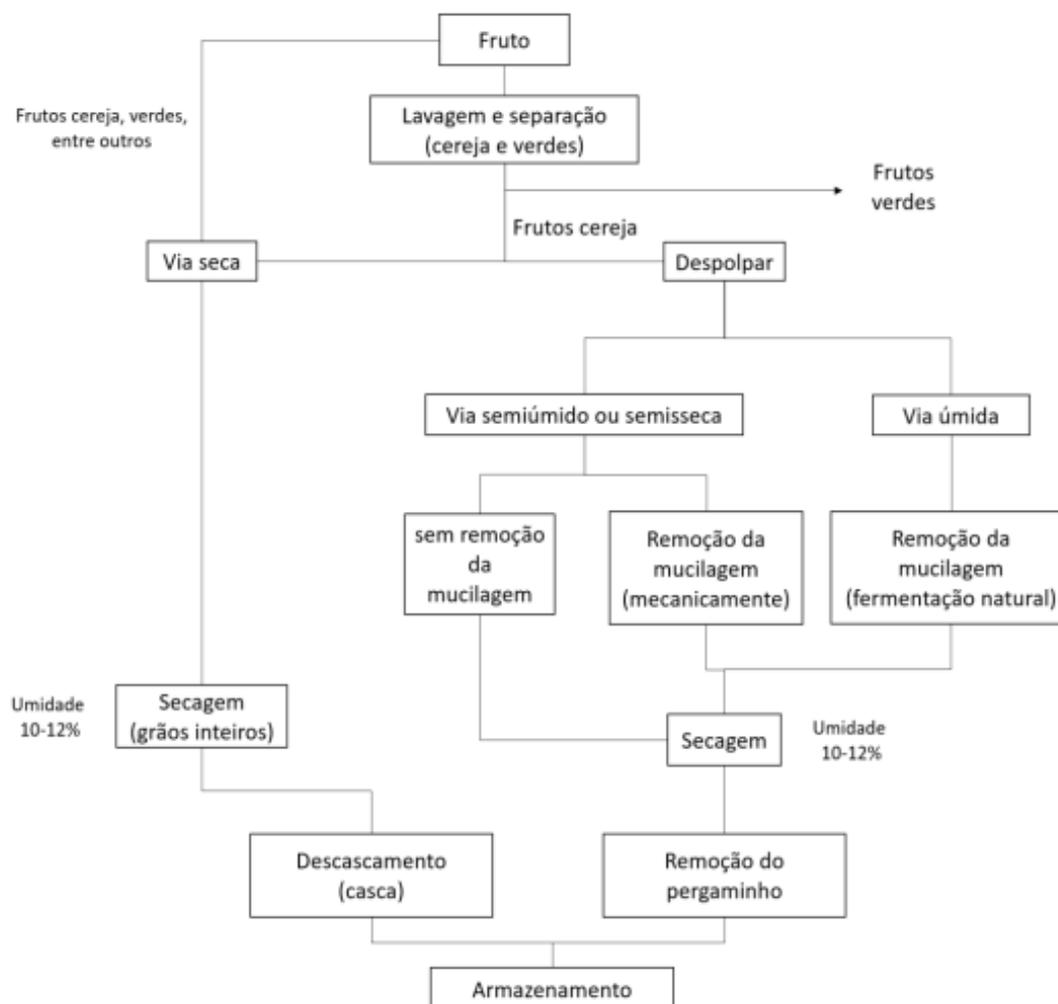
(A) Diferentes estágios de maturação, (B) corte transversal do fruto com a casca removida, (C) grão com mucilagem, (D, E) grãos após secagem com o pergaminho e (F) grão cru com a película prateada. Fonte: DURÁN et al., 2017.

2.2.1 Processamento do café

No ponto de colheita, o café é colhido de forma manual ou mecânica. Com exceção do processamento de colheita seletiva manual, os frutos são colhidos em diversos estágios de maturação, desde verdes a maduros. Como os grãos verdes não estão fisiologicamente bem desenvolvidos e diminuem a qualidade da bebida de café, estes podem ser removidos em processos de lavagem, na qual os frutos são separados de acordo com seu estágio de maturação (DURÁN et al., 2017).

O fluxograma da Figura 3 demonstra o processamento pós-colheita do café. Os frutos podem passar por três tipos de processamento: via seca, via semi-seca e via úmida. Ao final, é obtido o grão cru, que é o grão seco coberto ou não com o perisperma.

Figura 3: Fluxograma do processamento pós-colheita do café.



No processamento por via seca, os frutos colhidos são secos em sua forma integral, com a casca, em terreiros de cimento ou terra. Podem também passar pela secagem artificial em secadores. Após secagem, a uma umidade em torno de 12%, é realizado seu beneficiamento, com a remoção da casca, polpa, mucilagem, pergaminho e parte do perisperma (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012).

Na via úmida, o café pode ser processado por três diferentes maneiras: o descascado, quando a casca e parte da mucilagem são removidas por descascadores mecânicos; o desmucilado, no qual se remove a casca e o máximo de mucilagem por abrasão em desmuciladores mecânicos; e o despulpado, quando se tem a remoção mecânica da casca seguida pelo processo de fermentação, com completa remoção da mucilagem. No processo de fermentação, as sementes são dispostas em tanques de fermentação com grande volume

de água, no qual os microrganismos utilizam a mucilagem, polpa e açúcares como substrato, resultando no grão sem casca, polpa e mucilagem. Então, os grãos vão para o processo de secagem, podendo ocorrer, além dos terreiros e secadores artificiais, em plataformas suspensas (DURÁN et al., 2017, BOREM, 2004; PIMENTA, 2003).

No processamento por via semi-seca, os frutos também passam pelo processo para remoção da polpa, porém a fermentação ocorre nos terreiros ou secadores (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009).

2.2.2 Resíduos

A crescente preocupação com a diminuição da disposição dos resíduos da agroindústria direto no meio ambiente tem resultado em novas pesquisas e formas de sua utilização. Além da utilização eficiente dos resíduos agroindustriais, há também procura de formas de agregar valor a esses resíduos (AJILA et al., 2011).

Em diversas etapas de beneficiamento e processamento, a indústria cafeeira gera diversos resíduos. No processamento por via seca, o principal resíduo é a casca seca. Já para os cafés processados por via úmida, os resíduos gerados são a casca e polpa do café cereja, podendo ainda ter a água residuária dos processos de lavagem e fermentação (CAMPOS et al., 2017; MURTHY e NAIUDU, 2012).

Segundo CAMPOS et al. (2017) as águas residuárias do processamento úmido são, muitas vezes, descartadas de forma inadequada. Os efluentes líquidos do café cereja podem chegar a uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em torno de 12.500 mg / L, o que está muito acima do permitido pela legislação vigente, estipulado em 60 mg / L para a DBO. Ainda segundo os autores, o dimensionamento das lagoas e equipamentos utilizados no tratamento dos efluentes líquidos são muitas vezes subestimados, sendo seu descarte realizado com os limites de DBO acima do permitido.

A borra é considerada o último resíduo orgânico do café. A disposição deste resíduo inclui, em sua maioria, descarte em esgoto ou aterros, incineração, alimentação de gado e utilização como enchimento e adsorvente em material termofixo (GARCIA e DEL BIANCHI, 2015). A borra pode apresentar teores de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênico, conferindo atividade antioxidante ao resíduo (ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012).

GARCIA e DEL BIANCHI (2015) determinaram o alto teor de compostos fenólicos e ácido clorogênico na casca, polpa e borra do café (Tabela 2). Na borra não foi detectado ácido clorogênico, sendo a presença de compostos fenólicos associados a compostos como cafeína e trigonelina. A casca foi a que apresentou maior concentração destes compostos, apresentando assim maior atividade antioxidante.

Segundo SOETHE et al. (2016) a eficiência de um antioxidante é associada à sua capacidade de sequestrar radicais livres, sendo os compostos fenólicos responsáveis pela transferência de hidrogênio, neutralizando assim a ação desses radicais. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário e sua síntese pode ser aumentada em resposta a condições de estresse. Ainda de acordo com os autores, os compostos fenólicos presentes nos alimentos são responsáveis pelo amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa.

Tabela 2: teor de compostos fenólicos, ácido clorogênico e atividade antioxidante por DPPH da casca, polpa e borra de café.

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹)	Ácido clorogênico (µg mL ⁻¹)	% DPPH* Reduzido
Casca	159,50 ± 1,06 ^A	1927,63 ± 0,73 ^A	23,1-78,0
Polpa	72,88 ± 0,71 ^C	516,83 ± 1,50 ^B	25,8-67,6
Borra	77,25 ± 0,24 ^B	-	15,1-28,6

Fonte: GARCIA e DEL BIANCHI, 2015. As médias que não compartilham uma letra na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A polpa apresenta relevantes teores de açúcares totais e redutores, os quais podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos. MENEZES et al. (2013) trabalhando com a extração da fração solúvel da polpa para uso em processo fermentativo (Tabela 3), encontraram teor de 5,12 % para açúcares totais e 4,01 % para açúcares redutores na polpa que passou por processo de moagem em liquidificador industrial seguido de prensagem. No estudo, os autores utilizam também tratamentos que envolvem emprego de temperatura em autoclave (121 °C) e banho maria (60 °C), concluindo que o melhor processo para se obter o extrato da polpa, para emprego em fermentações, é a moagem em temperatura ambiente seguido da prensagem.

Tabela 3: Teores médios e desvios padrão de polifenóis, açúcar total e açúcar redutor na polpa de café e extratos de polpa de café, em base úmida.

Amostra / Tratamento	Açúcares totais (%)	Açúcares redutores (%)	Polifenóis (%)
Polpa	2.17 ± 0.11	1.85 ± 0.05	0.30 ± 0.01
Polpa prensada	4.69 ± 0.25	4.01 ± 0.13	0.08 ± 0.01
Polpa moída e prensada	5.12 ± 0.32	4.01 ± 0.21	0.08 ± 0.01

Fonte: MENEZES et al. (2013).

2.3 Mel

A Instrução Normativa nº 11, de 20 de Outubro de 2000 (BRASIL, 2000), classifica o mel como o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.

Devido sua composição, o mel pode ser considerado como um suplemento alimentar, visto seus teores de compostos funcionais como α -tocoferol, ácido ascórbico, compostos fenólicos e flavonoides (MENDES et al., 1998). A complexa mistura de carboidratos, como glicose e frutose, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, minerais, enzimas, cera e pigmentos faz do mel um ótimo ingrediente, muitas vezes utilizado para melhorar a palatabilidade de medicamentos e para adoçar e enriquecer alimentos (AMORIM et al., 2018).

Em seu estudo, PEREIRA (2008) encontrou no mel teores de umidade de 16,20 %, pH de 3,84, acidez de 23,00 meq. ac. kg^{-1} e 0,17 % para cinzas totais. Foi encontrado também 68,03 % de açúcares redutores, sendo a glicose e frutose os constituintes maioritários. A razão frutose / glicose fornece indicações acerca do estado de cristalização do mel, de forma que quando o conteúdo de frutose é superior ao de glicose o mel apresenta-se fluido.

A composição do mel pode variar de acordo com a origem floral, mesmo quando produzidos por uma mesma espécie de abelhas (GUO et al., 2019). A Tabela 4 demonstra essa variação para 5 diferentes origens florais.

KEK et al. (2017), trabalhando com méis de diferentes origens comerciais, também encontraram variações nos teores de açúcares, variando de 39,92% a 48,44% para frutose e 26,72% a 41,96% para glicose. Os autores também encontraram variação no teor de proteínas, sendo de 0,06% a 0,66%.

Tabela 4: composição do mel de diferentes origens florais.

Composição	SH	VH	AH	RH	ZH
Frutose (g/100g)	41.26 ± 0.06	39.57 ± 0.14	39.66 ± 0.30	42.58 ± 0.12	39.29 ± 0.15
Glicose (g/100g)	35.83 ± 0.10	37.86 ± 0.13	38.52 ± 0.85	32.88 ± 0.17	28.75 ± 0.59
F + G (g/100g)	77.09 ± 0.16	77.43 ± 0.20	78.18 ± 1.15	75.47 ± 0.29	68.04 ± 0.69
Fenólicos totais (mg/100g)	18.11 ± 1.65	13.45 ± 0.74	40.54 ± 2.92	19.33 ± 2.16	63.97 ± 3.76
Ácido ascórbico (mg/kg)	136.00 ± 31.76	351.11 ± 44.39	300.00 ± 75.13	843.70 ± 45.40	1114.07 ± 93.37

Fonte: GUO et al. (2019). SH: *Schisandra chinensis*. VH: *Vicia dichroantha*.

AH: *Astragalus sinicus*. RH: *Robinia pseudoacacia*. ZH: *Ziziphus jujuba*.

Outro composto presente no mel é o hidroximetilfurfural (HMF), que pode ser formado pela desidratação de hexoses em meio ácido pela reação de caramelização ou pelas reações de Maillard. Um mel de qualidade apresenta baixos teores de HMF, uma vez que o aquecimento e maiores tempos de armazenamento aumentam a formação desse composto (Küçük et al., 2007). PEREIRA (2008) encontrou teor de 16,02 mg / kg de HMF em seu estudo com mel utilizado para produção de hidromel.

2.4 Hidromel

O hidromel pode ser a bebida alcoólica mais antiga da história, sendo sua origem anterior ao vinho. Na região gelada do norte da Europa, o hidromel já foi considerado bastante popular, pelo fato de as condições climáticas não serem favoráveis ao desenvolvimento da uva (AMORIM et al., 2018; PEREIRA, 2008).

A legislação brasileira, pela Instrução Normativa nº 64 de 23 de abril de 2008 (BRASIL, 2008), define o hidromel como a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica de uma solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável.

As bebidas à base de mel são geralmente muito doces e de pouco corpo. Assim, a adição de polpa, suco ou pedaços de frutas podem contribuir com o aumento da acidez e outros nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos na fermentação. As frutas tem sido muito utilizadas por serem ricas em carboidratos, minerais, vitaminas, carotenoides, e compostos antioxidantes, fenólicos e sulfúricos (AMORIM et al., 2018).

Apesar das altas concentrações de açúcares fermentescíveis, o mel apresenta baixos teores de nitrogênio e minerais. Essa deficiência de nutrientes associada ao baixo pH faz com que a fermentação do mosto de hidromel necessite de um longo período de tempo. Por essa razão, a suplementação do meio e correção do pH são de grande importância na produção de hidroméis de qualidade. Longos períodos de fermentação podem levar ao crescimento de fungos com consequente produção de aromas indesejáveis (FERRAZ, 2015). Segundo PEREIRA (2008), os mostos de hidromel apresentam baixo pH devido a uma combinação de ácidos orgânicos naturais do mel. A correção dos valores de pH antes do início da fermentação pode diminuir o tempo do processo.

As etapas de produção do hidromel são a preparação e correção do mosto, com correção dos teores de sólidos solúveis e pH, preparo do pé de cuba, inoculação de leveduras, fermentação, clarificação e envase (MILESKI, 2016).

AMORIM et al. (2018) padronizaram o mosto contendo mel, polpa de acerola e água destilada para 30 °BRIX na produção de hidromel. O pH foi ajustado para 5,0 e foram inoculadas 10^8 células viáveis por mL. A adição da polpa de fruta melhorou o crescimento celular, com maior concentração de células durante a fermentação com relação ao controle. Houve também aumento no consumo de substrato e maior produção de etanol.

MENDES-FERREIRA et al. (2010) iniciaram a fermentação do mel a 22 °BRIX, incubado a 25 °C, com diferentes tratamentos com adição ácidos orgânicos e fosfato de diamônio. No estudo, os autores mostram que suplementação do meio com fosfato diamônio reduziu o tempo total de fermentação, melhorou a degradação dos açúcares e resultou em bebidas com melhor perfil de compostos aromáticos. A adição dos ácidos orgânicos não apresentou alteração no crescimento microbiano, não afetando a fermentação de forma positiva ou negativa.

PEREIRA et al. (2013) testaram em seu estudo diferentes taxas de inoculação para produção de hidromel. As fermentações iniciaram com 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 células por mL, concluindo que maiores taxas de inóculo diminuem o tempo de fermentação, mas podem levar a uma menor produção de compostos aromáticos desejáveis. Por outro lado, as taxas maiores de inoculação podem diminuir o espaço para contaminação microbiana. Estes contaminantes, por sua vez, produzem metabólitos indesejáveis que diminuem as qualidades sensoriais da bebida.

Atualmente, muitas leveduras são utilizadas para a produção do hidromel, sendo as mesmas encontradas na fermentação de vinhos, cervejas e champanhes. Em sua maioria, estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas, resultando em numerosos compostos produzidos no meio.

2.4.1 Compostos voláteis

Dentre os compostos voláteis que definem as características sensoriais do hidromel se encontram os álcoois, ésteres, aldeídos e ácidos carboxílicos. A concentração destes compostos no hidromel varia com a qualidade do mel, condições de fermentação e tempo de maturação da bebida (MENDES-FERREIRA et al., 2010).

LI e SUN (2019) encontraram um total de 23 ésteres voláteis em hidroméis produzidos com mel de diferentes origens florais, sendo que todos os ésteres apresentaram diferenças significativas quanto a sua concentração nas bebidas. De acordo com os autores, os ésteres voláteis contribuem com a percepção de floral e frutado no buquê aromático do hidromel. O composto volátil mais abundante encontrado foi octanoato de etila, seguido por dodecanoato de etila, 9-decenoato de etila, acetato de fenetilo, acetato de etila e hexanoato de etila.

PASCOAL et al. (2019) identificaram os álcoois (73,2 %) como os voláteis mais abundantes do hidromel, representados pelo 3-metil-1-butanol. Em seguida, os compostos voláteis de maior concentração foram os acetatos (19,1 %), compostos carbonílicos (5,5 %) e ésteres etílicos (1,2 %).

Os álcoois superiores encontrados nas bebidas fermentadas são produtos do metabolismo secundário das leveduras, podendo contribuir de forma positiva ou negativa

sobre o aroma. Em concentrações inferiores a 300 mg / L contribuem de forma desejável com a complexidade aromática da bebida (SWIEGERS e PRETORIUS, 2005).

2.5 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica (Figura 4) é o processo de oxidação anaeróbia parcial da glicose. Pela via glicolítica a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato, que pela ação da enzima piruvato descarboxilase são descarboxiladas, formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de gás carbônico. Cada acetaldeído é reduzido a uma molécula de etanol. Além do álcool etílico e CO₂, são produzidos outros metabólitos, como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, etc (CARDOSO, 2013).

O processo fermentativo pode ocorrer de forma espontânea ou pelo uso de culturas selecionadas. Quando espontânea, o processo ocorre por ação das leveduras selvagens, aquelas presentes naturalmente nas cascas dos frutos, equipamentos, ambiente e sem nenhum tipo de inoculação externa. Assim, as fermentações espontâneas não são produto da ação de uma única espécie de levedura, e sim de uma sucessão de espécies de leveduras diferentes ao longo da fermentação (TORIJA et al., 2003), o que proporciona menor controle ao processo.

hidrolisar oligossacarídeos em glicose e tolerar alta concentração de açúcar (osmotolerante) fazem dessa linhagem de levedura a mais indicada. Outras características desejáveis dessa espécie de levedura são a rápida iniciação da fermentação, eficiente conversão de açúcares a etanol, resistência ao dióxido de enxofre, formação de componentes do buquê e capacidade de floculação (CARDOSO, 2013; VENTURINI et al., 2010).

MILESKI (2016), utilizando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Red Star champagne, Lalvin EC 1118 e Fleischmann) na produção do hidromel, identificou a cepa Red Star champagne como a de maior capacidade de conversão de substrato em etanol. A levedura Lalvin EC 1118 produziu uma bebida mais equilibrada quanto ao teor alcoólico e açúcares redutores residuais, enquanto a levedura Fleischmann apresentou menor capacidade de conversão de açúcar em álcool, fornecendo a bebida com menor teor alcoólico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima

A polpa e casca de café cereja derivada do processamento úmido foram cedidas por produtor da cidade de Campos Altos, Minas Gerais, situada na região do Alto Paranaíba. A amostra da safra 2019 foi congelada e armazenada em freezer a -18 °C no Laboratório de Pesquisas Avançadas do Departamento de Ciência dos Alimentos, até o momento das análises. No momento do processo de extração, as polpas foram descongeladas e homogeneizadas junto ao líquido exsudado durante o descongelamento.

As borras também foram congeladas, sendo levadas ao freezer logo após o preparo do café.

O mel utilizado na fermentação foi obtido no comércio local de lavras, sendo de origem multifloral, principalmente de flores típicas do Cerrado Mineiro.

3.2 Obtenção do extrato da polpa e casca de café

As amostras de casca e polpa foram trituradas juntas em liquidificador industrial, sem adição de qualquer solvente, sendo a parte líquida separada por filtração em organza. A parte sólida foi pensada em prensa manual Macanuda, onde o líquido oriundo da prensagem foi misturado ao filtrado.

3.3 Análises das matérias primas

3.3.1 Extrato da casca e polpa de café cereja

3.3.1.1 Umidade / Sólidos solúveis:

Foi determinada seguindo o *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 2011), utilizando-se um refratômetro de Abbe. A leitura do índice de refração foi transformada em umidade de acordo com a tabela de Chataway, sendo a temperatura corrigida para 20 °C.

3.3.1.2 Açúcares redutores e totais:

Os açúcares foram determinados pelo método da Association of Official Agricultural Chemists (2005) e foram dosados de acordo com a metodologia Somogyi, adaptada por Nelson (1994). A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 510 nm, sendo os resultados expressos em porcentagem.

3.3.1.3 Acidez:

A acidez foi determinada pelo método volumétrico, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

3.3.1.4 pH:

Foi utilizado potenciômetro digital, modelo Quimis, tipo Q-400 A.

3.3.2 Mel

Os teores de umidade, sólidos solúveis, açúcares redutores e totais, acidez e pH foram determinados conforme descrito no item 3.3.1.

3.3.2.1 Proteínas:

Para o mel determinou-se ainda o teor de proteínas por metodologia padrão propostas pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRAL (AOAC, 2005). Para conversão do teor de nitrogênio total da proteína, este foi multiplicado pelo fator 6,25.

3.3.2.2 Cinzas:

O teor de cinzas das amostras foi determinado por incineração em mufla a 550 °C, segundo o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

3.3.2.3 Reação de Fiehe, Reação de Lugol e Reação de Lund

Para verificar a pureza do mel, foram realizados os testes de **Reação de Fiehe; Reação de Lugol e Reação de Lund** (IAL, 2008), garantindo que as amostras utilizadas não passaram por adulterações e fraudes.

3.3.2.4 Fenólicos totais:

O conteúdo fenólico total foi determinado de acordo com o método adaptado por FolinCiocalteu (WATERHOUSE, 2002). O extrato diluído de forma conveniente foi misturado com 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2mL de solução a 20% de carbonato de sódio (4%). A mistura foi agitada e mantida à temperatura ambiente, durante 2 horas, no escuro. A absorbância foi medida a 750 nm. Soluções aquosas de ácido gálico foram utilizadas para construção da curva padrão, conforme Figura 7 do Anexo. Os resultados foram expressos como g equivalente de ácido gálico equivalente (EAG) / 100g de amostra.

3.3.3 Borra

3.3.3.1 Hidroximetilfulfural

O hidroximetilfulfural foi determinado por metodologia indicada pela Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. A metodologia seguida foi a estabelecida pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005), utilizando-se as soluções de Carrez 1 (ferrocianeto de potássio) e Carrez 2 (acetato de zinco). Sua quantificação foi realizada por meio do espectrofotômetro UV/VIS a 284 e 336 nm, sendo a Equação 1 utilizada para o cálculo da concentração de HMF:

$$\text{HMF (mg / kg)} = \frac{\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336} \times 149,7 \times 5}{m} \quad (1)$$

Onde:

Abs₂₈₄ = leitura da absorbância da amostra a 284 nm;

Abs₃₃₆ = leitura da absorbância da amostra a 336 nm;

149,7 = (126/16830) x (1000/10) x (1000/5);

126 = massa molecular do HMF;

16830 = absortividade molar do HMF a 284 nm;

1000 = conversão de g para mg;

10 = diluição de 5 g de mel para 50 mL;

1000 = conversão de g para kg;

m = massa da amostra (g).

3.4 Fermentação

Na fermentação, foi utilizado o mel diluído com água destilada estéril como controle. Para os tratamentos com adição de borra, o mel foi diluído com solução de água estéril contendo 15% de borra. Nos tratamentos com adição do extrato da casca e polpa de café, o mel foi diluído com o extrato. Todos os tratamentos foram diluídos para 22 °BRIX.

Antes de se iniciar a fermentação, os mostos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos, sendo adicionado o inóculo após o meio resfriar e atingir 30 °C.

O pH dos mostos foi ajustado para 5,0 usando carbonato de cálcio ou NaOH 0,1 N. Todos os meios foram suplementados com extrato de levedura (5 g / L), peptona (5 g / L), cloreto de magnésio (0,05 g / l), sulfato de amônio (0,5 g / l) e fosfato dibásico de potássio (0,1 g/L) (AMORIM et al., 2018).

Os meios foram preparados de forma que todas as fermentações fossem iniciadas a 22 °BRIX e pH 5,0. Após a correção destes parâmetros, os meios seguiram para BOD a 20 °C e apenas quando estabilizada a temperatura dos mostos foram inoculadas as leveduras pré-ativadas em água estéril.

Logo após inoculação os meios foram agitados para dispersão do inóculo no mosto, seguindo o restante da fermentação sem agitação.

3.4.1 Preparo do inóculo

Com o propósito de reativar as células das leveduras, quantidade suficiente para obter valores iguais a 10^9 células viáveis/mL foram adicionadas em 50 mL de água destilada estéril, a 25 °C, por 30 minutos. Passado esse tempo a viabilidade das células foi checada utilizando coloração diferenciada em azul de metileno em Câmara de Neubauer, com objetivo de garantir contagem inicial de células viáveis de 10^8 por mL de mosto no início de cada fermentação.

3.4.2 Planejamento experimental

Após a realização do preparo do inóculo descrito na seção 3.4.1 foram realizadas as fermentações para os diferentes tratamentos (Tabela 5). Todas as fermentações foram realizadas em 3 repetições.

Tabela 5: Fermentações realizadas com as respectivas composições do mosto e leveduras empregadas.

Tratamento	Composição do mosto	Levedura
C Lalvin	Mel	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin EC 1118
C Red	Mel	<i>Saccharomyces bayanus</i> Red Star champagne
E Lalvin	Mel + extrato	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin EC 1118
E Red	Mel + extrato	<i>Saccharomyces bayanus</i> Red Star champagne
B Lalvin	Mel + borra	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin EC 1118
B Red	Mel + borra	<i>Saccharomyces bayanus</i> Red Star champagne

3.4.3 Fermentação do mosto

Para iniciar a fermentação, foi adicionado quantidade de inóculo igual a 10% do volume do mosto a ser fermentado garantindo contagem inicial de células viáveis iguais a 10^8 por mL de mosto. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 1 L, contendo 700 mL de meio e inóculo, sendo dispostos em incubadora à temperatura de 20 °C. Os Erlenmeyers foram adaptados com válvula tipo airlock, utilizada para liberar o CO₂ produzido durante a fermentação. Assim, o CO₂ desloca o ar e garante que as leveduras cresçam em condições anaeróbias.

A fermentação ocorreu até o cessar do desprendimento de gás carbônico, assim como estabilização do índice de refração e parada do consumo de açúcares. Para o estudo cinético foram retiradas amostras do mosto fermentado no tempo 0 e a cada 24 horas, onde foram realizadas as análises de açúcares redutores totais, viabilidade celular em câmara de Neubauer, contagem de células em placas, massa seca e pH. Ao final da fermentação, foi determinado também o teor alcoólico.

3.4.4 Análises do processo fermentativo

3.4.4.1 Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer

A contagem e a viabilidade foram realizadas em câmara de Neubauer após diluições adequadas, utilizando-se a coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

3.4.4.2 Massa seca ou biomassa

As amostras coletadas, após centrifugação e separadas do sobrenadante, foram secas em estufa, a 60 °C, por 24 horas, colocadas em dessecador, por 30 minutos e pesadas em balança analítica (ANDRIETTA; ANDRIETTA; RODRIGUES, 1995).

3.4.4.3 Açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares foram determinados pelo método da Association of Official Agricultural Chemists (2005) e foram dosados de acordo com a metodologia Somogyi, adaptada por Nelson (1994). A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 510 nm, sendo os resultados expressos em porcentagem.

3.4.4.4 pH

Foi utilizado potenciômetro digital, modelo Quimis, tipo Q-400 A.

3.4.4.5 Fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{p/s}$) e eficiência fermentativa (E_f)

O fator de conversão do substrato em etanol foi calculado em gramas de etanol produzido por gramas de açúcares redutores totais consumidos, empregando-se a Equação 2.

$$Y_{p/s} = \frac{P}{(S_0 - S)} \quad (2)$$

Em que:

P = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

S₀ = concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação (g ART/L);

S = concentração de açúcares redutores totais no final da fermentação (g ART/L).

A eficiência fermentativa é a fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol. A eficiência fermentativa foi calculada pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (Equação 3).

$$E_f = \left(\frac{Y_{p/s}}{0,511} \right) * 100 \quad (3)$$

3.4.4.6 Fator de conversão de substrato em células (Y_{x/s})

Expressa a massa celular produzida em relação ao consumo de ART. Este parâmetro fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido, sendo calculado pela Equação 4:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Em que:

X₀ = concentração inicial de células da fermentação (g de matéria seca / L de meio);

X = concentração final de células da fermentação (g de matéria seca / L de meio).

3.4.4.7 Produtividade em etanol

A produtividade em etanol (Q_p) expressa o teor produzido de etanol em certo intervalo de tempo. A produtividade em etanol foi calculada empregando-se a Equação 5:

$$Q_p = \frac{P}{t_f} \quad (5)$$

Sendo:

P = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

t_f = tempo total de fermentação (horas).

3.5 Caracterização do hidromel

As bebidas produzidas foram clarificadas com adição de bentonita previamente hidratada, com 24 horas de repouso para decantação sob refrigeração e posterior trasfega, de forma a separar e descartar o precipitado resultante. Cada mosto fermentado foi ainda filtrado em papel filtro. Após devida clarificação, os diferentes hidroméis foram analisados quanto às suas características físico-químicas, de acordo com a Instrução Normativa n. 24, de 8 de setembro de 2005, que regulamenta o Manual Operacional de Bebidas e Vinagre (BRASIL, 2005). Os resultados foram comparados com a Instrução Normativa n. 64 de 23 de abril de 2008, que aprova os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas (BRASIL, 2008) e a Instrução Normativa n. 34 de 29 de novembro de 2012, que complementa os padrões de identidade e qualidade do hidromel (BRASIL, 2012).

3.5.1 Teor alcoólico

Para a análise do teor alcoólico as amostras foram destiladas com posterior quantificação pela medida da densidade relativa do destilado a 20 °C (IAL, 2004)

3.5.2 Atividade antioxidante total pelo método de DPPH

Para se determinar a atividade antioxidante pelo método 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi utilizada metodologia proposta por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995).

Para quantificação foi utilizada uma alíquota de 100 µl da amostra previamente diluída em água destilada seguida da adição de 2,9 mL do radical DPPH 60 µM em solução etélica. Após esta etapa procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm.

O cálculo da concentração da atividade antioxidante (DPPH) foi realizado utilizando uma curva de calibração (Figura 8 do Anexo), utilizando diluições de Trolox na

concentração de 0,02 mM. Os resultados da Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox (TEAC) foram expressos em mM de equivalente Trolox (TE) L⁻¹ de amostra.

3.5.3 Atividade antioxidante total pelo método de ABTS^{·+}

A metodologia para determinação da atividade antioxidante pelo radical [2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-ácidosulfônico)] (ABTS^{·+}) foi realizado conforme descrito por SANT'ANA et al. (2012).

Uma primeira solução foi preparada utilizando 5 mL de solução aquosa de ABTS^{·+} a 7mM com 0,44 mL de persulfato de potássio a 140 mM, sendo homogeneizada por 16h sob ausência de luminosidade. Uma segunda solução foi preparada a partir da primeira, sendo diluídos 2 mL da primeira solução em metanol até se obter leitura de absorbância a 734 nm igual a 0,700. O ensaio foi realizado utilizando 50 µL da amostra com 5 mL da solução segunda solução em tubos de ensaio de vidro. As amostras foram diluídas em solução etílica de forma a se obter absorbâncias na faixa 0,2 – 0,8. Após 6 minutos em repouso na ausência de luz, a absorbância da mistura foi lida em espectrofotômetro a 734 nm. Para o branco, foi utilizado álcool etílico.

Para se calcular a concentração da atividade antioxidante realizou-se uma curva de calibração (Figura 9 do Anexo) com padrão Trolox. Os resultados da TEAC (capacidade antioxidante equivalente Trolox) foram expressos em mM de equivalente Trolox (TE) L⁻¹ de amostra.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme descrito no item 3.3.2.4.

3.6 Análise estatística

Com o objetivo de avaliar o desempenho das fermentações foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para verificar o efeito dos diferentes tratamentos, os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) pelo programa R Statistic 3.4.1, da R Foundation (Vienna, Áustria). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todo o experimento e análises foram realizados em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das matérias primas

4.1.1 Mel

Análises de fraude do mel se fazem necessárias devido ao alto índice de adulteração desta matéria prima, uma vez que se trata de um produto com alto valor comercial e de difícil produção. Os testes realizados mostram que o mel utilizado neste trabalho não sofreu adulteração (Tabela 6).

A reação Fiehe com resorcina em meio ácido pode indicar a presença de substâncias produzidas durante o superaquecimento de mel ou a adição de xaropes de açúcares. A reação com solução de Lugol foi utilizada para detectar a presença de amido e dextrinas nas amostras de mel.

Tabela 6: Testes de adulteração do mel utilizado para fermentação.

Teste	Resultado
Glicose comercial Lugol	Negativo
Glicose comercial Fiehe	Negativo
Teste de Lund	Negativo

Já o teste de Lund expressa a presença de substâncias albuminoides naturais do mel mediante precipitação. Na presença de mel puro, deve ser formado um precipitado no fundo da proveta no intervalo de 0,6 a 3,0 mL. Para o mel utilizado no presente trabalho, quando submetido ao teste de Lund, houve formação de precipitado de 2,05 mL.

Na Tabela 7 observam-se os valores para a caracterização físico-química das amostras de mel com seus respectivos padrões determinados pela Instrução Normativa nº 11 de outubro de 2000, que aprova o padrão de identidade e qualidade do mel. As amostras ficaram dentro do determinado para todos os parâmetros avaliados.

Tabela 7: Caracterização do mel utilizado para produção do hidromel.

Parâmetro	Resultado	Padrão de qualidade
Umidade (%)	18,84 ± 0,02	< 20,0
Teor de sólidos (%)	79,98 ± 0,08	NA
Açúcares redutores (g / 100g)	71,02 ± 0,11	> 65,0
Açúcares totais (g / 100g)	74,72 ± 0,15	NA
Proteínas (%)	0,32 ± 0,01	NA
Cinzas (%)	0,58 ± 0,01	< 0,60
Acidez livre (meq. / kg)	28,09 ± 0,16	< 50
pH	3,97 ± 0,00	NA
HMF (mg / kg)	8,10 ± 0,09	< 60,0

Resultado seguido de seu respectivo desvio padrão. O Padrão de Qualidade se refere ao determinado pela IN nº 11/2000 (BRASIL, 2000), sendo NA não se aplica.

A composição do mel pode variar de acordo com a espécie floral e abelha produtora (GUO et al., 2019). Ainda assim, os valores obtidos muito se assemelham aos encontrados por SALAZAR et al. (2017), FUJI; RODRIGUES e FERREIRA (2009) e MENDONÇA et al. (2008), havendo todos autores trabalhado na caracterização físico-química de méis de diferentes regiões do Brasil.

Em relação ao teor de compostos fenólicos totais, o mel apresentou $114,30 \pm 0,73$ mg EAG a cada 100g de amostra. Este teor é elevado quando comparado aos valores encontrados por TOMCZYK et al. (2020), sendo de 54,96 mg EAG $100g^{-1}$ para mel multifloral e 46,76 mg EAG $100g^{-1}$ para o mel de Acácia. Porém, muito se assemelha aos 127,00 mg EAG $100g^{-1}$ determinados por CIANCIOSI et al. (2020).

O mel utilizado no trabalho possui algumas vantagens em relação aos demais encontrados na literatura, como os baixos teores de acidez e HMF, que contribuem para o processo fermentativo. Outra vantagem é o alto teor de açúcares, possibilitando maior adição de extrato e borra na preparação dos mostos.

4.1.2 Borra e extrato da casca e polpa de café cereja

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da caracterização da borra e extrato utilizados. O extrato apresentou considerável teor de açúcares, contendo 7,0 °BRIX.

Tabela 8: Caracterização da borra e extrato da casca e polpa do café cereja.

Parâmetro	Borra	Extrato
Açúcares redutores (%)	1,45 ± 0,07	3,92 ± 0,11
Açúcares totais (%)	2,01 ± 0,04	5,54 ± 0,15
Acidez livre (meq. / kg)	19,1 ± 0,2	29,70 ± 0,14
pH	3,98 ± 0,02	3,54 ± 0,01
Fenólicos totais (mg EAG / 100g)	182,7 ± 1,9	132,5 ± 1,0

Observação: A porcentagem de açúcares redutores e totais equivalem a m/m para borra e m/v para Extrato.

A borra de café ainda apresentou concentração de hidroximetilfurfural (HMF) equivalente a $88,12 \pm 0,13 \text{ mg Kg}^{-1}$, ficando entre os $61,30$ e $110,00 \text{ mg Kg}^{-1}$ encontrados por MARTINEZ-SAEZ et al. (2017) e BENINCÁ (2019), respectivamente.

O HMF é formado durante a torrefação do café, através da desidratação da frutose e da sacarose, resultando em um intermediário do cátion frutofuranosil. Este intermediário, em meios de altas temperatura e baixa atividade de água, como o caso do café quando passa pelo processo de torra, rapidamente é convertido em HMF (LOCAS, YAYLAYAN, 2008; VIGNOLI et al., 2014). A temperatura empregada no processo de torra influencia diretamente na quantidade de HMF gerada. Segundo VIGNOLI et al. (2014), a formação do HMF se inicia em temperaturas próximas a $170 \text{ }^\circ\text{C}$, assim como a degradação da sacarose, atingindo a taxa máxima de formação a $230 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2 Processo fermentativo

4.2.1 Açúcares redutores totais

A cinética de consumo de açúcares redutores totais (ART) durante a fermentação pode ser observada através dos gráficos da Figura 5, sendo o A representando a levedura *Lalvin EC 1118* e B para o consumo da *Red Star Champagne*.

Para ambas leveduras o tratamento contendo a borra de café foi o que levou mais tempo para obter um decréscimo significativo das taxas de açúcares e estabilização dos teores de ART, indiciando, possivelmente, a presença de alguns inibidores provenientes da

borra para o processo fermentativo. A borra ainda ocasionou um maior tempo necessário para estabilizar os teores de ART. Em sua composição, a borra de café possui consideráveis teores de hidroximetilfurfural (HMF), que apresenta efeitos negativos comprovados aos microrganismos.

A fase lag de diversas leveduras pode ser prolongada pela presença do HMF, assim como pelo furfural (ALLEN et al., 2010). Estes compostos são responsáveis pela inibição da atividade enzimática, danos ao DNA e inibem a síntese proteica e de RNA, diminuindo assim a taxa de crescimento das leveduras (ALLEN et al., 2010; MODIG et al., 2002).

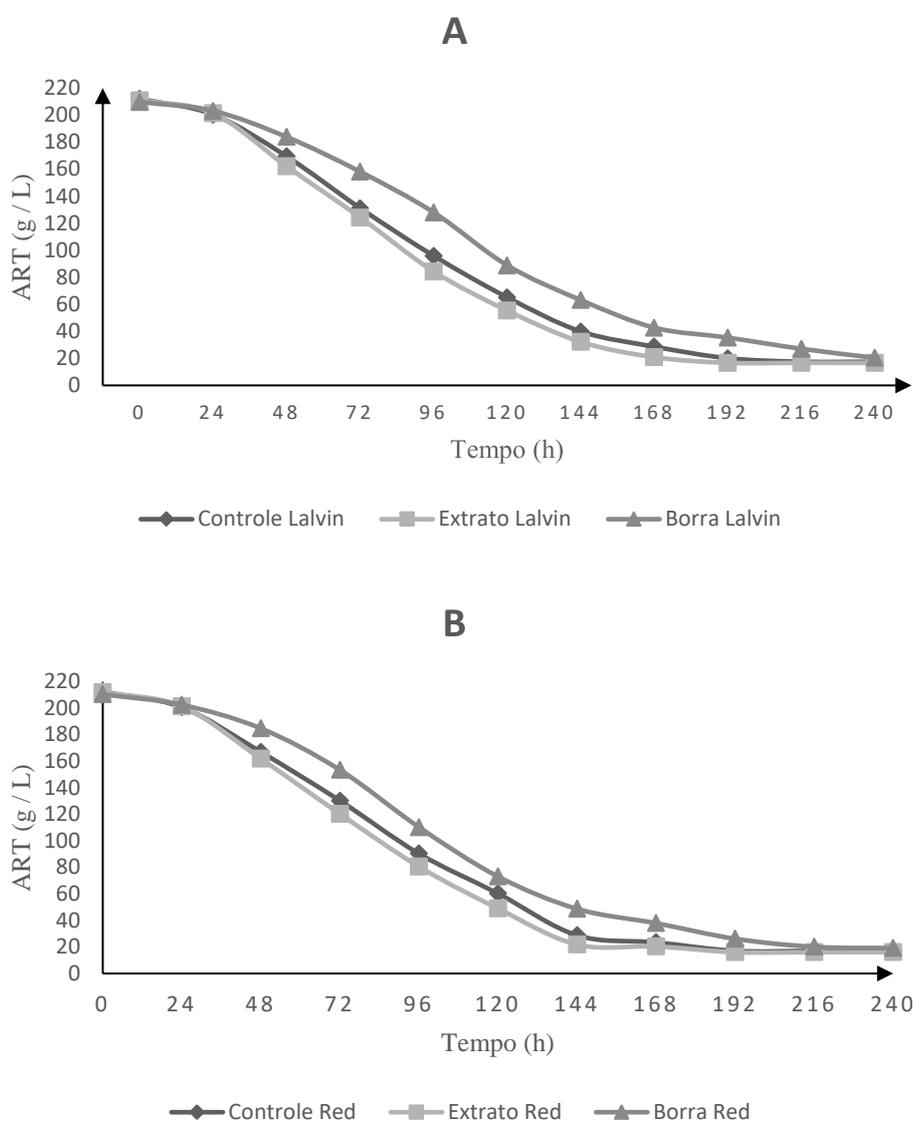


Figura 5: consumo de ART ao longo da fermentação, sendo a figura A representando a levedura *Lalvin EC 1118* e B para o consumo da *Red Star Champagne*.

Por outro lado, os mostos com adição do extrato da casca e polpa de café foram aqueles que obtiveram um decréscimo mais rápido de ART. Observa-se pela Figura 5 que a curva de consumo de açúcares para estes meios está sempre abaixo das demais, independente da levedura utilizada.

A utilização do extrato para diluição do mel pode ter elevado os nutrientes presentes no mosto. MARTINEZ et al. (2019) encontraram na biomassa (casca, polpa e mucilagem) de café cereja consideráveis teores de nitrogênio de fontes proteicas, além de minerais como cálcio, ferro, manganês e magnésio.

Os minerais desempenham importantes papéis no metabolismo fermentativo das leveduras. Em seu estudo SOUZA (2012) destaca o magnésio e manganês, os quais foram responsáveis pelo aumento no rendimento em etanol e diminuição do tempo necessário para estabilização dos açúcares totais na fermentação do caldo de cana pela *S. cerevisiae*.

De acordo com BASSO et al. (2011), estes nutrientes são importantes como cofatores enzimáticos e manutenção da homeostase. Porém, quando em excesso no meio, podem causar estresse osmótico das células das leveduras e comprometer o desempenho da fermentação.

4.2.2 pH

Durante a fermentação alcoólica as leveduras produzem ácidos orgânicos por vias secundárias, com consequente aumento na acidez da bebida e redução nos valores de pH (MÃRGAOAN et al., 2020). Na fermentação do mel, os ácidos succínico e acético podem ser os mais representativos. A acidificação do mosto devido à formação destes ácidos pode resultar no prolongamento do tempo de fermentação ou sua interrupção (SROKA e TUSZYNSKI, 2007).

O decréscimo nos valores de pH pode ser observado na Figura 6. Observa-se que os mostos contendo a borra de café foram os tratamentos com os menores valores de pH ao final da fermentação. Estes tratamentos também precisaram de mais tempo para decréscimo e estabilização dos valores de pH. Tal resultado vai de encontro aos valores de consumo de açúcares (Figura 5), indicando inibição na fermentação, possivelmente, pela presença do hidroximetilfurfural proveniente da borra de café.

O aumento da fase lag em fermentações nas quais se adiciona o inóculo de levedura pode prejudicar o controle e homogeneidade do processo fermentativo. O tempo gasto pelas

leveduras em colonizar o meio e se propagar abre espaço para possíveis microrganismos contaminantes. Esta contaminação pode acarretar em prejuízos sensoriais à bebida e comprometer sua segurança microbiológica. Em menores valores de pH o problema da contaminação bacteriana é minimizado (CARDOSO, 2013; MENEZES et al., 2013).

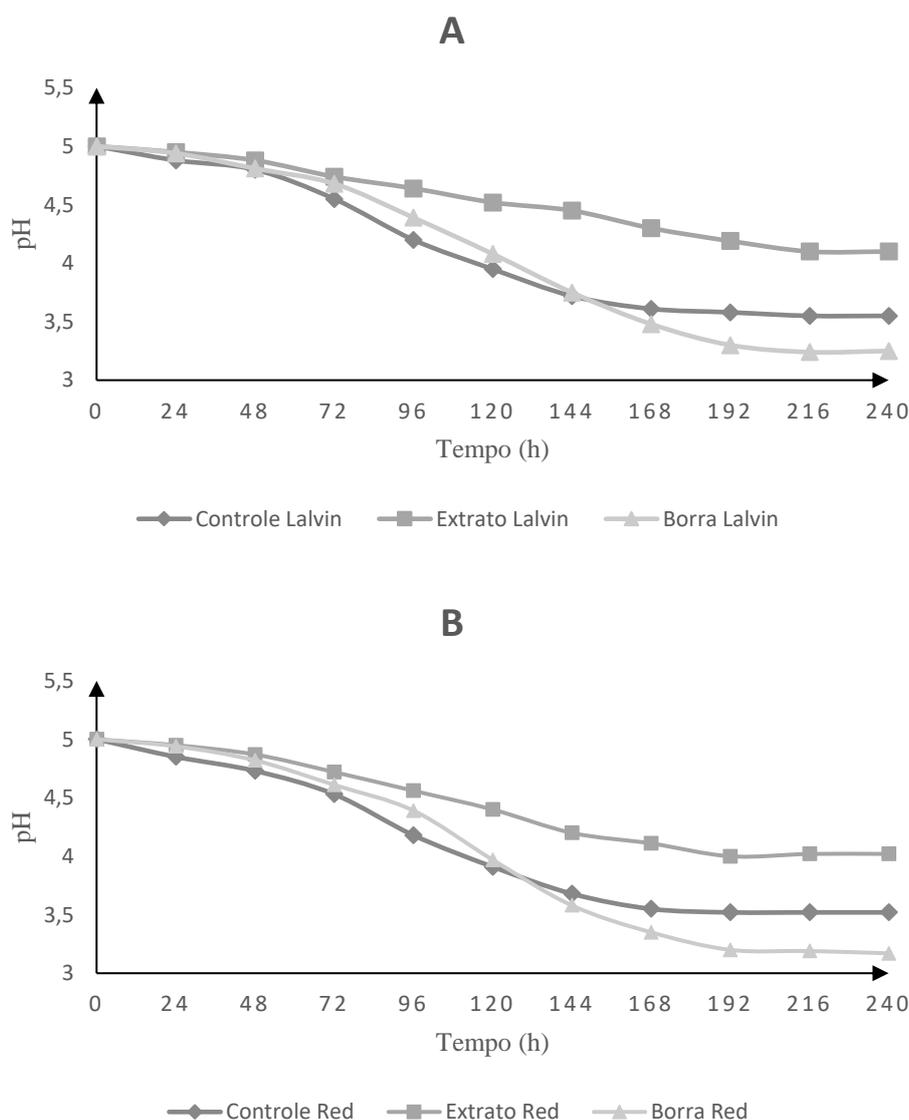


Figura 6: Variação de pH ao longo do processo fermentativo, sendo a figura A representando a levedura Lalvin EC 1118 e B para Red Star Champagne.

Para os meios contendo o extrato observa-se a menor variação dos valores de pH. MENEZES et al. (2013) estudando o uso do extrato da polpa de café para produção de bioetanol também encontraram efeito tamponante nos mostos contendo adição do extrato. Esse efeito pode ter favorecido o metabolismo das leveduras pela manutenção do pH em

faixas favoráveis à levedura. Os mostos contendo o extrato também foram aqueles que estabilizaram o consumo de açúcares (Figura 5) e desprendimento de CO₂ em menos tempo de fermentação.

4.2.3 Viabilidade celular e contagem de células em Câmara de Neubauer

Para os valores de viabilidade celular, após 24 horas de fermentação, o tratamento E Red foi o que apresentou mais células viáveis e B Lalvin o de menor quantidade de células viáveis, sendo de $98,55 \pm 0,93\%$ e $94,80 \pm 1,10\%$, respectivamente. Após 240 horas de fermentação, os menores valores de viabilidade celular foram para os tratamentos contendo a borra, sendo $64,27 \pm 0,80\%$ para B Lalvin e $66,30 \pm 1,17\%$ para B Red.

A adição do extrato contribuiu para o aumento da viabilidade celular durante todo o processo. Estes tratamentos foram os que apresentaram maior porcentagem de células viáveis ao final da fermentação, sendo encontradas $91,25 \pm 1,02\%$ de células viáveis para E Red e $90,70 \pm 0,97\%$ para o tratamento E Lalvin. Uma possibilidade ao aumento da viabilidade celular destes tratamentos é o efeito tamponante resultante da adição do extrato, diminuindo a influência do efeito do pH às leveduras.

Quando comparadas as viabilidades das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC 1118 e *Saccharomyces bayanus* Red Star Champagne, o fermento da Red Star apresentou maior quantidade de células viáveis em relação à cepa da Lalvin, quando empregadas em um mesmo tratamento, independente do tempo de fermentação.

Os valores de contagem de células totais em Câmara de Neubauer estão expressos na Tabela 9. Observa-se que os tratamentos contendo a borra foram aqueles que apresentaram maior contagem celular ao final da fermentação.

Tabela 9: Contagem de células totais em Câmara de Neubauer nas fermentações estudadas, sendo os resultados expressos em 10^8 células / mL.

Tempo	C Lalvin	E Lalvin	B Lavin	C Red	E Red	B Red
0	1,01±0,03	1,00±0,02	1,01±0,02	1,00±0,03	1,02±0,04	1,01±0,03
24	1,97±0,10	1,99±0,10	1,50±0,12	1,99±0,11	2,05±0,05	1,63±0,01
48	2,80±0,16	2,91±0,16	1,97±0,22	2,95±0,14	3,02±0,16	2,00±0,08
96	3,47±0,20	3,45±0,25	3,52±0,18	3,45±0,27	3,53±0,14	3,61±0,10
144	3,70±0,19	3,77±0,22	3,81±0,25	3,68±0,23	3,79±0,18	3,89±0,17
192	4,01±0,18	4,18±0,20	4,70±0,41	4,22±0,31	4,20±0,23	4,89±0,15
240	4,04±0,23	4,17±0,31	4,98±0,55	4,24±0,30	4,24±0,23	5,08±0,33

De forma geral, a levedura Red Star apresentou maior contagem de células totais ao longo do processo fermentativo quando comparada à Lalvin.

4.2.4 Parâmetros fermentativos

As cepas de levedura utilizadas no presente trabalho apresentaram boa adaptação ao mosto de mel, adicionados ou não do extrato e borra. Observa-se pela Tabela 10 que a *S. bayanus* Red Star Champagne se destacou com maiores valores de eficiência fermentativa (Ef) e produtividade em etanol (Qp), apresentando também maior conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$).

O estudo de MILESKI (2016) apresentou resultados semelhantes, no qual o aproveitamento, em termos de consumo de substrato presente no mosto, foi melhor para cepa da Red Star Champagne, quando comparada à Lalvin EC 1118 e ao levedo de panificação da Fleischmann. FERRAZ (2015) também encontrou superioridade da *S. bayanus* Red Star Champagne nestes parâmetros em relação a demais cepas na produção de hidromel, sendo sua Ef de 83,60%. O autor iniciou as fermentações a 20 °BRIX com 10^7 células / mL e conduziu o processo a 18 °C.

Apesar de serem importantes, estes parâmetros não devem ser os únicos levados em consideração para seleção de um microrganismo para produção de bebida alcoólica. A levedura utilizada como inóculo na fermentação do mel deve apresentar contribuições diretas no aroma da bebida, através de sua capacidade de sintetizar compostos aromáticos e voláteis, que realçam as propriedades sensoriais e nutricionais do hidromel (IGLESIAS et al., 2014).

Tabela 10: Produtividade em etanol (Q_p teor produzido de etanol em 240 horas de fermentação), eficiência fermentativa (E_f %), conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$ gramas de células produzidas por grama de ART consumido) e conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$ gramas de etanol produzido por gramas de ART consumidos).

Tratamento	Q_p (g / l . h)	E_f (%)	$Y_{x/s}$ (g cél. seca / g ART)	$Y_{p/s}$ (g etanol / g ART)
C Lalvin	0,33±0,02 ^{cd}	69,56±0,88 ^{cd}	0,16±0,01 ^{ab}	0,35±0,02 ^b
E Lalvin	0,36±0,02 ^c	71,14±0,73 ^c	0,17±0,02 ^a	0,36±0,01 ^b
B Lavin	0,31±0,01 ^d	67,68±1,08 ^d	0,15±0,01 ^{bc}	0,35±0,02 ^b
C Red	0,40±0,01 ^b	80,70±1,52 ^b	0,14±0,01 ^{bc}	0,41±0,03 ^a
E Red	0,46±0,03 ^a	84,45±1,17 ^a	0,13±0,01 ^c	0,43±0,02 ^a
B Red	0,34±0,02 ^{cd}	70,71±1,06 ^{cd}	0,15±0,02 ^{bc}	0,36±0,02 ^b

* Números seguidos por letras iguais na mesma coluna não se diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de significância.

4.3 Caracterização dos hidroméis

Na Tabela 11 está apresentada a caracterização das bebidas produzidas quanto aos teores de acidez total, pH, açúcares totais e teor alcoólico. De acordo com os valores de referência da IN n. 34 de 29 de novembro de 2012, apenas os resultados obtidos para a acidez total dos hidroméis estão fora do padrão. Para os demais parâmetros testados todas as bebidas se enquadram na legislação. O baixo valor de acidez total do mel utilizado na fermentação é um fator que pode ter corroborado com estes baixos índices finais.

A adição da borra diminuiu a produção de etanol, resultando em bebidas de menores teores alcoólicos. Por outro lado, a adição do extrato para diluição do mel resultou em bebidas de maior teor alcoólico. Quando comparados os teores alcoólicos, há diferença significativa entre os tratamentos Extrato e Controle ($p < 0,05$), sendo E Red > C Red e E Lalvin > C Lalvin. A bebida de maior graduação alcoólica foi E Red, com 13,88%, próximos ao limite de 14% estabelecido pela legislação vigente.

Diversos autores relataram o aumento da produção de etanol na fermentação do mel com adição de extratos e polpas vegetais. Estes substratos podem elevar a concentração de nitrogênio no meio. De acordo com VARELA, PIZARRO e AGOSIN (2004) bebidas de

maior graduação alcoólica são produzidas a partir de mostos com maior concentração de nitrogênio assimilável.

ARAÚJO et al. (2020) relataram o aumento da graduação alcoólica de hidroméis produzidos com adição de polpa de feijão caupi. Os autores ainda obtiveram resultados de maior crescimento celular e conversão de substrato em etanol para os meios adicionados da polpa. No estudo de MASCARENHAS et al. (2017) a concentração de etanol de hidromel adicionado de polpa de abacaxi foi 30% superior ao controle. A adição da polpa de abacaxi resultou também em maior viabilidade celular durante todo processo fermentativo.

Tabela 11: Caracterização físico-química dos hidroméis.

Tratamento	Acidez Total (meq. / L)	pH	Açúcares totais (g / L)	Graduação Alcoólica (% v/v a 20 C)
Padrão	50 - 130	-	> 3 (para hidromel suave)	4 - 14
C Lalvin	37,22±1,58 ^d	3,55±0,08 ^b	21,51±1,82 ^b	10,00±0,98 ^{cd}
E Lalvin	38,53±1,12 ^{cd}	4,10±0,12 ^a	20,83±1,77 ^b	11,93±0,80 ^b
B Lavin	41,84±0,70 ^{bc}	3,25±0,15 ^c	28,79±2,12 ^a	9,37±0,91 ^d
C Red	41,01±1,21 ^{bc}	3,52±0,07 ^b	19,44±1,55 ^{bc}	12,02±0,56 ^b
E Red	48,70±2,17 ^a	4,02±0,06 ^a	17,14±1,37 ^c	13,88±1,02 ^a
B Red	42,94±1,80 ^b	3,17±0,07 ^c	21,89±2,85 ^b	10,25±0,78 ^c

* Números seguidos por letras iguais na mesma coluna não se diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de significância.

**O padrão se refere ao disposto na Instrução Normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012.

Os teores de açúcares totais das bebidas são elevados quando comparados ao encontrado por SCHWARZ et al. (2020), sendo os valores de açúcares totais de 14,79 g.L⁻¹ para cepa *S. cerevisiae* AWRI-R2 e 16,8 g.L⁻¹ para *S. cerevisiae* QA23. Os autores iniciaram as fermentações a 20 °BRX e pH 3,6.

PEREIRA et al. (2019) produziram hidroméis com concentração de açúcares redutores variando de 21,71 a 25,70 g.L⁻¹ utilizando as leveduras *S. cerevisiae* QA23 e ICV D47. Ainda de acordo com os autores, hidroméis com maior teor de açúcares são mais apreciados pelos consumidores em relação aos hidroméis secos (maior graduação alcoólica e menor teor de açúcar).

Os valores de fenólicos totais (FT) e potencial antioxidante das bebidas pode ser observado na Tabela 12. Os resultados mostram que a adição da borra e do extrato contribuiu

também para o aumento do teor de compostos fenólicos nas bebidas em relação ao controle. Porém apenas o extrato aumentou a atividade antioxidante dos hidroméis.

Comparando as cepas de levedura, houve diferença significativa na concentração de FT ($p < 0,05$). A cepa da Lalvin produziu bebidas com maior concentração de fenólicos.

Os valores de compostos fenólicos totais muito se assemelham aos encontrados por CHITARRINI et al. (2020). Os autores utilizaram a *S. cerevisiae* EC 1118, obtendo FT variando de 289,09 a 304,44 mg EAG / L.

Tabela 12: Fenólicos totais (FT) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH.

Tratamento	FT (mg EAG / L)	ABTS (TEAC mmol/L)	DPPH (TEAC mmol /L)
C Lalvin	270,97±7,39 ^c	2,19±0,11 ^{bc}	2,30±0,11 ^b
E Lalvin	332,30±10,87 ^a	2,50±0,11 ^a	2,71±0,10 ^a
B Lavin	315,81±11,23 ^b	2,06±0,08 ^{bc}	2,10±0,10 ^{bc}
C Red	268,33±10,12 ^c	2,18±0,07 ^{bc}	2,27±0,10 ^b
E Red	307,25±8,92 ^b	2,31±0,09 ^{ab}	2,58±0,09 ^{ab}
B Red	309,88±14,02 ^b	1,99±0,12 ^c	1,94±0,09 ^c

*Números seguidos por letras iguais na mesma coluna não se diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de significância.

Com exceção do tratamento contendo a borra, maiores valores de FT elevaram também a atividade antioxidante da bebida. Os compostos fenólicos contribuem de forma positiva para a saudabilidade e potencial antioxidante das bebidas, uma vez que são capazes de sequestrar ou inibir oxigênio reativo, transferir elétrons para radicais livres e inibir enzimas oxidases. Como benefício relacionado ao consumo dos fenólicos podemos citar sua ação anti-inflamatória, analgésica e gastroprotetora. Além disso, estes compostos estão associados à inibição do crescimento de células cancerígenas e combate ao estresse oxidativo, apontado como causa da diabetes, doenças neurodegenerativas e arteriosclerose. Dessa forma, a ingestão moderada de bebidas ricas em compostos fenólicos está relacionada a efeitos benéficos à saúde humana (SOUZA et al., 2018; LÓPEZ-MIRANDA, et al., 2016.)

5 CONCLUSÕES

Fica evidente o potencial do extrato da casca e polpa de café cereja como diluente do mel na produção de hidromel. O extrato obtido apresentou considerável concentração de compostos fenólicos e de açúcares, além de pH favorável à fermentação. A adição do extrato ao mosto resultou em bebidas com maiores teores alcoólicos, maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O extrato contribuiu também para aumento na viabilidade celular durante a fermentação.

A utilização da borra de café, por sua vez, não apresentou efeitos positivos. Estes tratamentos resultaram em bebidas de menor teor alcoólico e menor atividade antioxidante. A borra também foi responsável pelo retardamento do processo fermentativo.

A *S. bayanus* Red Star Champagne apresentou melhor adaptabilidade ao meio, estabilizando em menor tempo os índices de açúcares redutores, além de apresentar melhores valores de eficiência fermentativa, produtividade em etanol e conversão de substrato em etanol. Já os mostos fermentados pela cepa *S. cerevisiae* Lalvin EC 1118 resultaram em bebida com maior concentração de compostos fenólicos e menor graduação alcoólica.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Análise do perfil de compostos fenólicos e voláteis dos hidroméis podem ajudar a elucidar a diferença entre as bebidas adicionadas do extrato da casca e polpa e da borra de café. Além disso, metodologias de análise sensorial podem ser empregadas para determinar se há diferença na aceitação e preferência entre as bebidas produzidas pelos diferentes diluentes do mel e cepas de levedura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Consumo de Café no Brasil aumenta 4,80% e chega a 21 milhões de sacas. Fevereiro, 2019. <http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/consumo/Press_release_consumo_final_vs_04_02_19.pdf>

AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1071-1080, 2011.

ALLEN, S. A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 2, 2010.

AMORIM, T. S. et al. Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 97, p. 561-569, 2018.

ANDRIETA, S. R.; ANDRIETA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1995.

ARAÚJO, G. S. et al. Mead production by *Saccharomyces cerevisiae* safbrew t-58 and *Saccharomyces bayanus* (premier blanc and premier cuvée): effect of cowpea (*vigna unguiculata* l. walp) extract concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 212-225, 2020.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18 ed. Gaithersburg, Maryland. AOAC, 2005.

BASSO, T. O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694-703, 2011.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Coffee, Tea, Cocoa. In: BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. (Eds.). **Food Chemistry**. 4. ed. Berlin: Springer, 2009.

BENINCÁ, D. B. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de borras de café oriundas de torras clara e escura e estudo do aproveitamento em muffins**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 4, p. 330-334, 1962.

BOREM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 22, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Instrução normativa n. 11 de 20 de outubro de 2000**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Brasília: Ministério da Agricultura – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2000.

BRASIL. **Instrução normativa n. 24 de 8 de setembro de 2005**. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

BRASIL. **Instrução normativa n. 34 de 29 de novembro de 2012**. Complementa os padrões de identidade e qualidade do fermentado de fruta, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto, sidra, hidromel, fermentado de cana e saquê ou sake. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012.

BRASIL. **Portaria nº. 64, de 23 de abril de 2008.** Aprovam os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermento de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008.

CAC. Codex Stan 12-1981. Codex Alimentarius Commission. **Codex Standard For Honey.** 2011.

CAMPOS, O. B. et al. Eficiência do tratamento de águas residuárias do processamento de café cereja descascado nas Fazendas Rio Doce, Caratinga, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev. Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 4, n. 8, p. 421-429, 2017.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana.** 3 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2013. 340p.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo de café no Brasil.** Instituto agrônomo (IAC). Campinas, p. 8. 2007.

CIANCIOSI, G. et al. The influence of in vitro gastrointestinal digestion on the anticancer activity of manuka honey. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, 2020.

CHITARRINI, G. Volatile profile of mead fermenting blossom honey and honeydew honey with or without ribes nigrum. **Molecules**, v. 25, n. 8, 2020.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café - Safra 2019.** v. 5, n. 2 - Segundo levantamento, 2019.

DURÁN, C. A. A. et al. Café: aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2017.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional Properties of Coffee and Coffee By-Products. **Food Research International**, v. 46, p. 488-495, 2012.

FERRAZ, F. O. **Estudo dos parâmetros fermentativos, características físico-químicas e sensoriais de hidromel**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo. Lorena, São Paulo. 2015.

FUJI, I. A.; RODIGUES, P. R. M.; FERREIRA, M. N. Physical-chemical characterization of honey of guarana (“*Paullinia cupana* var. *sorbilis*”) in Alta Floresta, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Saúde e Proteção Animal**, v. 10, n. 3, p. 645-653, 2009.

GARCÍA, L. R. P.; DEL BIANCHI, V. L. Antioxidant capacity in coffee industry residues. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 307-3013, 2015.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, New York, v.2, p. 371-383. Oct, 1963.

GUO, P. et al. Anti-alcoholic effects of honeys from different floral origins and their correlation with honey chemical compositions. **Food Chemistry**, v. 286, p. 608–615, 2019.

IAL. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz 2008.

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

KEK, S. P. et al. Classification of honey from its bee origin via chemical profiles and mineral content. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 19-30, 2017.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526-534, 2007.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, n. 11, p. 641-649, 1981.

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.

LOCAS, C. P.; YAYLAYAN, V. A. Isotope labeling studies on the formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis - GC/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6717–6723, 2008.

LÓPEZ-MIRANDA, S. et al. Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. **Food Chemistry**, v. 203, p. 379-385, 2016.

MÃRGAÃOAN, R. et al. Impact of fermentation processes on the bioactive profile and health-promoting properties of bee bread, mead and honey vinegar. **Processes**, v. 8, n. 9, 2020.

MARTINEZ, C. et al. Biomass and Bioenergy Characterization of residual biomasses from the coffee production chain and assessment the potential for energy purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 68–76, 2019.

MARTINEZ-SAEZ, N. et al. Use of spent coffee ground as food ingredient in bakery products. **Food Chemistry**, v. 216, p. 114-122, 2017.

MASCARENHAS, A. M. O. et al. Efeito da concentração de polpa de abacaxi (*Ananas Mill*) na produção de hidromel. **XXI Seminário de Iniciação Científica**, n. 21. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.

MENDES, E. et al. Quality evaluation of Portuguese honey. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 219-223, 1998.

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

MENDONÇA, K et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, v. 38, n.6, p. 1748-1753, 2008

MENEZES, E. G. T. et al. Use of Different Extracts of Coffee Pulp for the Production of Bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 673-687, 2013.

MILESKI, J. P. F. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Tecnológica do Paraná. Londrina – PR, 2016.

MODIG, T. et al. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 3, p. 897-903, 2012.

NAYAK S.; HARSHITHA M.J. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology** 11:86–91, 2012.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, n.2, p. 375-80, May 1994.

PASCOAL, A. et al. Impact of fining agents on the volatile composition of sparkling mead. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 1, p. 125-133, 2019.

PEREIRA, A. P. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel**. 81p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, Portugal. 2008.

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

PEREIRA, A. P. et al. Volatile composition and sensory properties of mead. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, 2019.

PERROIS, C.; STRICKLER, S. R.; MATHIEU, G.; LEPELLEY, M.; BEDON, L.; MICHAUX, S.; HUSSON, J.; MUELLER, L.; PRIVAT, I. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). **Planta**, v. 241, n. 1, p. 179–191, 2014.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. Ed. 2. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. Cap. 4, 5. 454 p.

SAENGER, M. et al. Combustion off coffee husks. **Renewable Energy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 103-121, 2001.

SALAZAR, L. N. Physicochemical characterization of honey from different regions in Rio Grande do Sul State labeled with different inspection service stamps. **Ciência e Natura**, v. 39, n. 3, p. 656-665, 2017.

SANT'ANA, L. D. O. et al. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 135-140, 2012.

SCHWARZ, L. V. Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. **Journal of Food Science Technology**, v. 57, n. 8, p. 2840-2851, 2020.

SOETHE, C. et al. Quality, phenolic compounds, and antioxidant activity of 'Tupy' and 'Guarani' blackberries stored at different temperatures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, Brasília, v.51, n.8, p.950-957, 2016.

SOUZA, A. V. et al. Correlations between the phenolic compounds and antioxidant activity in the skin and pulp of table grape varieties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SOUZA, R. B. **Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pernambuco. Recife, 2012.

SROKA, P.; TUSZYNSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. **Food Chemistry**, v.104, n. 3, p. 1250-1257, 2007.

SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. Yeast Modulation of Wine Flavor. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, 131–175, 2005.

TOMCZYK, M. et al. The effect of honey variety on the quality of honey powder. **JMBFS**, v. 9, n. 5, p. 949-954, 2020.

TORIJA, M. J. et al. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.

VARELA, C., PIZARRO, F., & AGOSIN, E. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3392-3400, 2004.

VENTURINI, W. G. F. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia.** 1 ed. Ed. Edgard Blucher Ltda, 2010. 461p.

VIGNOLI, J. A et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279–285, 2014.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, p. 1-4, 2002.

WINTGENS, J. N. **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production**. WILEYVCH. 2 ed. Weinheim, Switzerland, 2009. p. 983.

WOLDESENBET, A. G.; WOLDEYES, B.; CHANDRAVANSI, B. S. Bio - ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia. **SpringerPlus**, p. 0–6, 2016.

ZHANG, S. J. et al. Following coffee production from cherries to cup: microbiological and metabolomic analysis of wet processing of coffea arabica. **Applied and Environmental Microbiology**. February, p. 1–22, 2019.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 699-710, 2004.

ANEXOS

Figura 7: Curva padrão de ácido gálico para análise de conteúdo de compostos fenólicos totais.

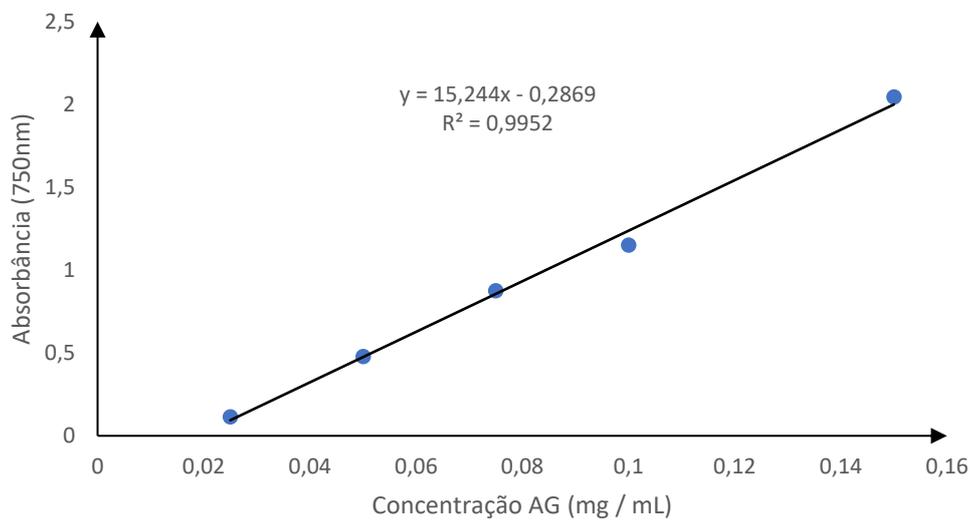


Figura 8: Curva padrão Trolox para análise de atividade antioxidante pelo radical DPPH.

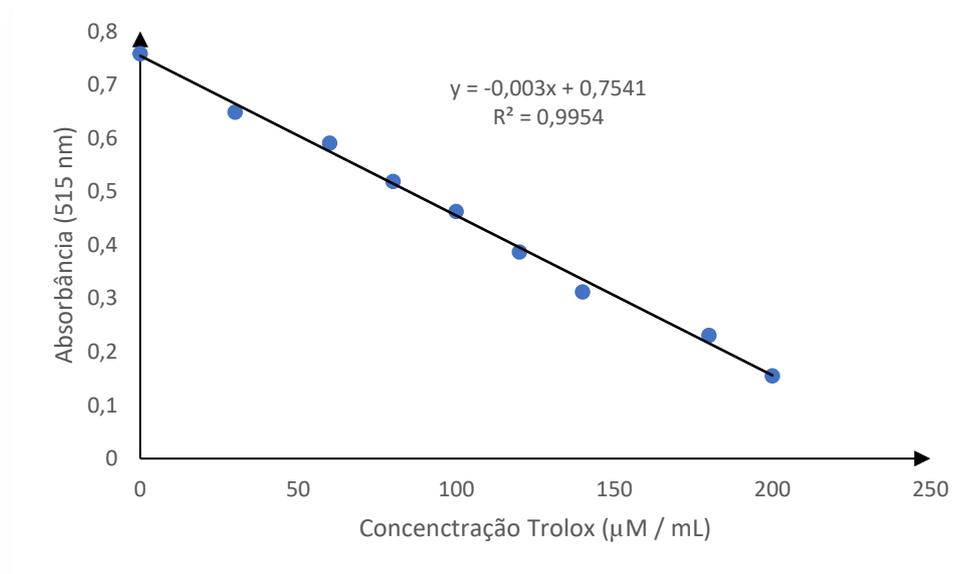


Figura 9: Curva padrão Trolox para análise de atividade antioxidante pelo radical ABTS⁺.