

## ISOLAMENTO DE LEVEDURAS, PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROMEL

VÂNIA CASARI MUSSATO, MOZART DE AZEVEDO MARINS, JULIANA DA SILVA COPPEDE

Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)

<vaniacasari@hotmail.com>, <mmarins@unaerp.br>

<jcoppede@unaerp.br>

DOI: 10.21439/conexoes.v18i0.2825

**Resumo.** O hidromel é uma bebida fermentada, bastante antiga, produzida a partir da fermentação da mistura de mel e água. Ainda que não seja tão popular quanto outras bebidas fermentadas, como cerveja e vinho, há uma crescente demanda pelo produto nos últimos anos no Brasil. Este estudo teve como objetivo utilizar leveduras isoladas do mel e de resíduos de hidroméis para produzir e caracterizar hidroméis de acordo com a legislação vigente. Inicialmente as leveduras isoladas foram caracterizadas molecularmente por sequenciamento de regiões de DNA ribossômico. O resultado do sequenciamento revelou a presença das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Essas leveduras foram submetidas a teste piloto de crescimento em meio de cultura e mosto de mel, e mostraram crescimento em ambos. A partir da escolha de três leveduras, sendo uma do gênero *Rhodotorula* duas do gênero *Saccharomyces*, o processo de fermentação do mosto de mel e água foi realizado sem suplementação nutricional. Os resultados físico-químicos mostraram que o hidromel produzido a partir das leveduras utilizadas está em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente (cinzas totais, extrato seco reduzido, teor alcoólico e teor de açúcares). Além disso, foram realizados testes de análise sensorial com 100 consumidores, não treinados no produto. Os resultados dos testes de aceitação e ranqueamento não apresentaram diferenças significativas entre as amostras de hidromel, demonstrando não haver preferência por uma amostra específica. Contudo, o resultado do teste de intenção de compra, comprovou que o produto tem potencial de expansão no mercado consumidor.

**Palavras-chave:** análise sensorial; fermentação; mel; *rhodotorula mucilaginosa*; *Saccharomyces cerevisiae*.

## YEAST ISOLATION, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MEAD

**Abstract.** Mead is an ancient fermented beverage produced by fermenting a mixture of honey and water. Although mead is not as popular as other fermented beverages such as beer and wine, there has been a growing demand for the product in recent years in Brazil. This study aimed to use yeasts isolated from honey and mead residues to produce and characterize mead in accordance with current legislation. In the first stage of the study, yeasts were isolated. Then, the genetic material of these yeasts was extracted, purified and sequenced. The sequencing result revealed the presence of two yeast species (*Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa*). The yeasts were submitted to a pilot growth test in culture medium and honey must, and showed growth in both. From the choice of three yeasts, the fermentation process of the honey and water wort was carried out without nutritional supplementation. The physical-chemical results showed that the mead produced from the yeasts used complies with the parameters established by legislation. Sensory analysis tests were carried out with consumers not trained in the product. The results of the acceptance and ranking tests did not show significant differences between the mead samples, demonstrating that there is no preference for a specific sample. However, the result of the purchase intention test proved that the product has potential for expansion in the consumer market.

**Keywords:** sensory analysis; fermentation; honey; *rhodotorula mucilaginosa*; *saccharomyces cerevisiae*.

## 1 INTRODUÇÃO

O hidromel é uma bebida milenar, produzida a partir da fermentação de uma mistura de mel e água, podendo ser adicionado especiarias, flores, frutas e grãos. O mel que devido a sua baixa umidade não fermenta em condições ambiente, quando armazenado com água torna-se apto a iniciar um processo de fermentação espontânea. Uma das evidências mais antigas de sua produção baseada na fermentação de arroz, fruta e mel data de 7 mil a.C. na China (McGovern *et al.*, 2004). O aumento da produção agrícola contribuiu para o declínio na popularidade do hidromel que, embora presente em várias culturas, passou a ter um valor maior do que as bebidas derivadas de frutas ou grãos, abrindo espaço para a ascensão de bebidas fermentadas mais acessíveis como cervejas, cidras e vinhos. Atualmente, os avanços em pesquisa e processos de produção abrem novas perspectivas de mercado consumidor, principalmente na África, América e Europa (Demets, 2020).

A fim de buscar novas soluções para o reaproveitamento de resíduos provenientes da extração de mel, o hidromel pode ser uma fonte alternativa para agregar valor ao produto na cadeia produtiva do mel (Fernandes Denise, 2009). Entretanto, para ganhar escala industrial, alguns desafios precisam ser superados e incluem a padronização do produto, visando atender questões de legislação, produção e estabilidade. Para tanto, pesquisas sobre as fontes de mel e leveduras a serem utilizados são necessárias para parametrizar os processos fermentativos.

O interesse e familiaridade dos consumidores brasileiros frente ao hidromel tem sido objeto de estudos, revelando que embora permaneça relativamente desconhecido e pouco explorado o produto causa curiosidade e intenção de compra em um mercado recentemente explorado (Santos Keli Cristina, 2021).

O hidromel pode apresentar variações de acordo com o tempo de fermentação, quantidade e qualidade do mel utilizado na diluição, escolha da levedura e da graduação alcoólica. Pode ser classificado em doce, espumoso, licoroso ou seco, segundo a sua tecnologia de fabricação (Ramalhosa *et al.*, 2011). Sack é um exemplo de hidromel com maior quantidade de mel e, consequente graduação alcoólica superior ao tradicional. Além das variações de mel, outra variável na produção resulta em hidromel espumante ou frisanter, no qual o dióxido de carbono dissolvido no produto se faz essencial, podendo ser decorrente da segunda fermentação realizada após o engarrafamento da bebida ou do processo de carbonatação (Iglesias, 2012).

As diferentes linhagens de leveduras, mesmo que de uma mesma espécie podem produzir diferentes perfis de

compostos aromáticos e voláteis, sendo estes os responsáveis pelas características finais do hidromel (Pereira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2017). Embora exista baixa oferta de linhagens de leveduras específicas, as leveduras empregadas no processo de fermentação do hidromel são na sua grande parte do gênero *Saccharomyces*, frequentemente utilizadas para produção de sidras e vinhos, selecionadas para apresentar alta velocidade de fermentação, boa floculação e tolerância à concentração de álcool, açúcares e ácidos orgânicos (Brunelli; Orsi; Filho, 2016).

Para a produção de hidromel, é necessário um controle do processo de fermentação, pois as leveduras podem sofrer a interferência de condições de estresse, como baixos valores de pH ou altas concentrações de etanol e açúcares totais (Pereira *et al.*, 2009).

As metodologias clássicas para a identificação de leveduras baseiam-se nas características fisiológicas, nutricionais, morfológicas e sexuais, entretanto exigem um expressivo volume de testes que podem não ser totalmente conclusivos, especialmente quando é necessária a identificação de cepas pertencentes à mesma espécie, deste modo, técnicas de biologia molecular são de extrema relevância para uma identificação precisa (Carvalho, 2010).

Acredita-se que nos primórdios, o hidromel originou-se da fermentação espontânea por leveduras selvagens presentes no mel ou em cascas de frutas adicionadas ao processo. Embora esse tipo de fermentação tenha um papel importante como fonte de novas cepas de leveduras aptas ao melhoramento e seleção, atualmente os avanços biotecnológicos e as produções em escala comercial, são utilizadas leveduras comerciais selecionadas a fim de atingir uma padronização do processo (Mendes-Ferreira *et al.*, 2010).

Em uma fermentação, aproximadamente 90% dos açúcares são transformados em etanol e os ou 10% restantes em ácidos orgânicos, álcoois superiores, glicerol, e outros constituintes em quantidades “desprezíveis” (Oliveira *et al.*, 2012). Para um melhor desempenho da fermentação do hidromel é necessário encontrar e isolar cepas de leveduras adequadas para a composição específica do mosto de mel ou associadas às condições de estresse encontradas, entre os quais destacam-se alta osmoticidade, baixa capacidade tampão, baixa concentração de nutrientes essenciais, baixo teor de minerais e baixo pH (Iglesias, 2014).

Steinkraus (1966) realizaram um amplo estudo dos fatores que influenciam a fermentação para produção de hidromel. Para tanto, durante a obtenção dos produtos se analisou a velocidade da fermentação, o pH ideal de fermentação, a temperatura utilizada para fermen-

tação das leveduras, e os tipos de méis utilizados para produção de hidromel. O pH desejável de fermentação encontrado no estudo ficou entre 3,7 – 4,6, sendo que abaixo dessa faixa a taxa de fermentação se apresentava muito lenta. Ao nível de pH 3,7, apresentava boa taxa de fermentação, mas suficientemente baixo para inibir crescimento de bactérias indesejáveis. No pH adequado e com os fatores de crescimento adicionados, a fermentação pode ser completa em duas semanas, a no máximo duas semanas e meia (Steinkraus, 1966). Na legislação brasileira são relacionados o teor de açúcar em g/L, o que permite classificar o hidromel como seco ou suave; graduação alcoólica (4-14%) e cinzas totais (limite mínimo 1,5 g/L) (Brasil, 2012). Sendo assim, a legislação vigente estabelece parâmetros de produção, limitando a graduação alcoólica e regulamentando os ingredientes permitidos, o que tem impacto direto na diversificação e na inovação do produto. Existem poucos documentos de patentes e pesquisas sobre o hidromel no Brasil quando comparados com outros países como China e Estados Unidos, revelando uma lacuna entre os aspectos produtivos, de qualidade química, sensorial e bioativa do hidromel que podem e devem ser exploradas pelos produtores, pesquisadores e indústrias (Simão *et al.*, 2022). Além disso, o mercado brasileiro do hidromel é caracterizado predominantemente por produções artesanais e de pequena escala, com poucos empreendimentos industriais consolidados (Nakada Lidia Urbano Caciatori, 2020). Por este motivo, a disponibilidade do hidromel em estabelecimentos físicos é limitada, com comercialização predominantemente online no Brasil (Denise, 2016). Por seu potencial econômico, tem surgido a partir dos entusiastas que iniciaram a produção caseira, pequenas fábricas de hidromel, devido à semelhança na demanda e popularização com a expansão do mercado de cervejas artesanais alguns anos atrás (Fabri, 2017).

No país, eventos como a 'Copa Kylix', promovida pela Associação Sul Brasileira de Produtores de Hidromel (ASH), e o Encontro Anual de Produtores de Hidromel (EAPAH) contribuem para a divulgação desse fermentado. A competição internacional mais significativa é a Mazer Cup International (MIC), realizada nos Estados Unidos, com mais de duas centenas de inscrições apenas na categoria de hidroméis artesanais (Bakulic, 2018). Nesse contexto, surge a necessidade de explorar tanto o potencial de mercado quanto as oportunidades de inovação tecnológica e industrialização, visando não apenas atender à demanda crescente por essa bebida ancestral, mas, promover o desenvolvimento econômico e a valorização dos apicultores locais.

Para atingir os objetivos de um produto aceito pelo

mercado consumidor deve-se realizar a análise sensorial do mesmo, nesse contexto os métodos de análise sensorial podem ser classificados em três categorias principais: análise discriminativa, análise descritiva e análise afetiva. A análise discriminativa estabelece a diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre amostras, é utilizada para detectar alterações na qualidade ou na formulação do produto. Os métodos de análise descritiva são utilizados para quantificar e descrever características sensoriais de atributos específicos, devido à necessidade de precisão, os métodos discriminativos e descritivos devem ser realizados por pessoas treinadas e qualificadas. Já nos métodos de análise afetiva os consumidores avaliam os produtos alimentícios quanto a sua percepção pessoal, preferência e intenção de compra e não há necessidade de treinamento prévio para sua realização (Lawless *et al.*, 2010).

Considerando os pontos abordados, esse trabalho teve por objetivo isolar leveduras presentes em resíduos de hidromel e amostras de mel, caracterizar o hidromel produzido e avaliar a aceitação do produto frente ao mercado consumidor.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Mel

O mel utilizado nessa pesquisa, classificado como mel silvestre (quando não há a predominância de uma florada específica), foi cedido em agosto de 2019, pelo apiário Fazenda Mussato CNPJ 64.699.267/0001-00, localizado em Monte Alto estado de São Paulo, Brasil. O entreposto responsável pelo envase e beneficiamento do mel é localizado em Paraíso-SP (20° 59' 57.996"S, 48° 46' 55.070"W), tendo registro no SISP (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo) sob o nº 660/005.

### 2.2 Leveduras comerciais

Foram utilizadas leveduras comerciais, sendo C1 fermento culinário da marca Fleischmann® e C2 leveduras comerciais M05 da empresa Jack Magroves® específicas para produção de hidromel.

### 2.3 Isolamento de leveduras selvagens

As leveduras foram isoladas a partir de amostras de resíduos de hidromel artesanal, mel fermentado e mel escuro *in natura*. A princípio, os hidroméis artesanais foram produzidos, utilizando-se leveduras comerciais Ec1118 da empresa Lalvin, ao final o processo de clarificação, os resíduos que decantam são classificados como lama, esta contém leveduras e sólidos insolúveis

como resíduos de cera, proteínas e cinzas. Essas amostras de lama foram diluídas com água destilada, 100 µL foram espalhados com ajuda de alça de Drigalski em placas de ágar Sabouraud (SAB) acrescido de cloranfenicol e estreptomicina ambos na concentração de 25 µg/mL.

Decorrido o período de incubação de 72 horas, observou-se visualmente o crescimento de colônias de leveduras nas amostras de resíduos de hidromel e na amostra de mel *in natura*, em placas de petri. Posteriormente as colônias foram isoladas através de método de estrias múltiplas utilizando alça de platina, em meio SAB sólido.

## 2.4 Extração de DNA genômico

A partir do crescimento das colônias isoladas anteriormente foi realizada a extração de DNA genômico, segundo protocolo rápido de isolamento de DNA de leveduras de acordo com Green e Sambrook (2012) algumas modificações (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Sambrook, Joseph and Russell, David W., 2001).

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio Yeast Potato Dextrose (YPD) líquido e mantidas a 30°C em agitação *overnight*. Após crescimento os tubos foram centrifugados, o meio descartado e o *pellet* ressuspenso em 150 µL de tampão STES [2 M Tris-Cl (pH 7.6) 0.5 M NaCl; 0.01 M EDTA; 0.1% (w/v) SDS]. Foi adicionado cerca de 0,1 g de glass beads, 60 µL de tampão TE e 180 µL de fenol clorofórmio em cada amostra, seguido por processo agitação em vortex por 1 minuto. Os tubos foram centrifugados na máxima rotação por 5 minutos em temperatura ambiente, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionado 400 µL de etanol 100% gelado e 20 µL de acetato de sódio. Após incubação por 15 minutos, em freezer a -20°C, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C em velocidade máxima, descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 100 µL de etanol 70% que foi centrifugado na velocidade máxima por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após secagem, o sedimentado foi ressuspenso em 40 µL de tampão de eluição (TE). Posteriormente o DNA genômico total foi quantificado em NanoDrop (Implen NanoPhotometer® P-360) e a integridade do material genético verificada em gel de agarose 0,8%.

## 2.5 Amplificação e análise da região ITS do DNA ribossomal

Para a amplificação da região ITS1 e ITS2 foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Figura 1). Os oligonucleotídeos foram escolhidos com base em nucleotídeos conservados do gene 5.8S rDNA de *Saccharomyces* (White *et al.*, 1990).

As reações de amplificação da região 5.8S-ITS conduzidas em termociclador *Bioer GenePro* TC-E-96G, foram realizadas nos seguintes parâmetros de ciclo térmico: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão em 72°C por 45 segundos; e uma etapa de extensão final em 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,001%) e submetidos à eletroforese com corrente constante de 100 V.

## 2.6 Purificação

Os fragmentos de DNA detectados no gel de agarose resultante de PCR foram purificados por meio de *kit GenElute (Gel Extraction Kit – Sigma)*. Os fragmentos de interesse foram extraídos do gel de agarose, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e armazenados em microtubos que foram anteriormente pesados, a fim de que em se deduzindo sua massa do peso do microtubo contendo o gel de agarose, obtivéssemos o peso do gel contendo o fragmento de interesse. Posteriormente, adicionou-se 300 µL de *Gel Solubilization Solution* para cada 100 mg de gel de agarose, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 60°C até total dissolução do gel. As colunas de ligação foram preparadas com 500 µL de *Column Preparation Solution* em cada coluna, posteriormente centrifugadas por 1 minuto e descartado o líquido. No tubo contendo o gel dissolvido foi adicionado isopropanol 100% no mesmo volume que gel, as amostras foram colocadas nas colunas de ligação, e centrifugadas por 1 minuto descartado a fase líquida ao final. Foi adicionado 700 µL de *Wash Solution* nas colunas de ligação e centrifugado por 1 minutos duas vezes. As colunas foram transferidas para novos tubos e adicionado 50 µL de *Elution Solution*, seguiu-se incubação de 1 minuto e posterior centrifugação por 1 minuto, obtendo-se ao final uma solução líquida contendo os fragmentos de DNA.

## 2.7 Sequenciamento

Microtubos *eppendorf* de 500 µL, contendo os fragmentos de DNA amplificados que foram purificados do gel de agarose (item 2.6), foram secas, por 18 horas, em estufa a 30°C. Após secagem, as amostras previamente identificadas, foram enviadas para a empresa ACTGene Análises Moleculares (Universidade Federal

**Figura 1:** Localização da região de rDNA entre *primers* ITS1 e ITS4.

Fonte: Adaptado de (White *et al.*, 1990)

do Rio Grande do Sul, 2003) que realizou o sequenciamento da região amplificada entre os *primers* ITS1 e ITS4. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger (1977). Esse método de identificação molecular de espécies criado em 1977 por Sanger, se baseia no sequenciamento de genes e genomas. Esse método é realizado através da incorporação de desoxinucleotídeos e didesoxinucleotídeos marcados, à uma cadeia de DNA em crescimento utilizando um molde de DNA alvo que se deseja sequenciar. Após a incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados a extensão da cadeia é interrompida gerando fragmentos de diferentes tamanhos, então os fragmentos são organizados do menor ao maior tamanho e submetidos a leitura por meio de fluorescência, identificando assim a sequência das bases nitrogenadas na cadeia de DNA. Esse método de sequenciamento sofreu evoluções, mas continua sendo, ainda hoje, o método de tecnologia que gera dados de melhor qualidade (Chen, 2001).

As sequências obtidas são normalmente depositadas pelos pesquisadores em bases de bancos de dados de genes, como Genbank, EMBL ou DDBJ, a comparação das sequências obtidas com as do banco de dados permite que o organismo possa ser identificado, além de gerar um alinhamento com sequências mais similares dentro de limites predefinidos (Rosa *et al.*, 2003).

## 2.8 Alinhamento

O alinhamento das sequências (*forward e reverse*) foram editadas no Chromas versão 2.6.6 ([www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)) e montadas no programa CLUSTALX versão 2.1 ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)). As sequências foram alinhadas e comparadas com toda base de dados de sequências de DNA disponíveis através da Internet usando a Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A semelhança percentual entre os fragmentos foi calculada pelo BLAST®.

## 2.9 Curva de crescimento

A curva de crescimento das leveduras foi realizada em meio *Sabouraud* líquido e em mosto. O meio de cultura *sabouraud* foi acrescido de cloranfenicol e estreptomicina ambos na concentração de 25 µg/mL, enquanto o mosto foi preparado pela diluição de mel em água mineral na concentração de 30 °Brix e aquecido em banho à 60 °C por 20 minutos.

Foram selecionadas 3 cepas de leveduras: A31 isolada de lama de hidromel, A51 isolada de mel silvestre e M05 cepa comercial Mangrove Jacks - M05 - Mead®, previamente isoladas em placas de ágar *sabouraud* e pré-inoculadas em meio líquido.

O meio de cultura e o mosto foram inoculados em duplicata na concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células e mantidos em agitador orbital *shaker* a 30°C e 200 rpm, amostras foram coletadas a cada hora no período de 12 horas, em cada amostra foi realizada a contagem celular e leitura de absorbância. A contagem de células foi realizada em câmara de *Neubauer* e a absorbância medida em espectrofotômetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™) em comprimento de onda de 550 nm.

## 2.10 Preparação e fermentação do mosto

O pré-inóculo das cepas de leveduras selecionadas foi preparado em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo meio *Sabouraud* com cloranfenicol e estreptomicina na concentração de 25 µg/mL, mantidos a 30°C e 200 rpm por 24 horas. As leveduras foram ajustadas para concentração de 106 células, lavadas com solução salina, ressuspensas em mosto e então adicionadas ao volume total do mosto.

O mosto foi preparado pela diluição de mel silvestre em água mineral obtendo-se 30 °Brix, esterilizado em banho maria a 60°C por 20 minutos em panela de alumínio e armazenado em 3 baldes fermentadores de polipropileno com volume total de 5 litros.

A fermentação transcorreu com volume final de 3

litros. Estes foram hermeticamente fechados com válvula de fermentação do tipo “*airlock*”, que permite a saída do gás carbônico produzido durante a fermentação e impede a entrada do oxigênio e outros agentes contaminantes. A fermentação foi conduzida com os recipientes mantidos em estufas com temperaturas monitoradas de 30°C, acompanhada semanalmente até a estabilização dos sólidos solúveis que se deu a 17 °Brix na quarta semana de fermentação.

Após estabilização do processo fermentativo em 17 °Brix, foi então realizada a primeira trasfega para frascos de vidro de 4 litros, que foram armazenados em geladeira a 4 °C por 20 dias para a ocorrência da clarificação.

Após a clarificação houve a segunda trasfega para garrafas de vidro verde previamente limpas e autoclavadas, as garrafas foram fechadas com tampa de metal, e armazenadas por período de 60 dias em temperatura ambiente sem incidência de luz.

## 2.11 Parâmetros do hidromel

### 2.11.1 Sólidos solúveis (*Brix*)

Os sólidos solúveis (*Brix*) dos tratamentos foram avaliados com refratômetro manual da marca ATAGO modelo N-1E, devidamente calibrado segundo as instruções do fabricante.

### 2.11.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado pelo método potenciométrico utilizando um pHmetro de bancada da marca MS Tecnopon modelo mPA210, previamente calibrado.

### 2.11.3 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada em microplacas segundo metodologia Santos *et al.* (2017), utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante.

### 2.11.4 Teor alcoólico

O teor alcoólico corresponde à porcentagem de álcool existente em uma amostra e foi realizado em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) *Campus* Sertãozinho. As medições foram realizadas por espectrometria NIR em medidor de álcool e extrato Anton Paar modelo Alex 500. O valor, expresso em % (v v-1), foi obtido automaticamente recorrendo a uma curva de calibração (ANALYTICA - EBC, 2008).

### 2.11.5 Extrato seco

As amostras de hidromel foram pesadas e então submetidas à evaporação do álcool em temperatura ambiente (30±5°C) por 3 dias, seguida de liofilização com o objetivo de extrair totalmente a água presente nas amostras, então foi novamente pesado e obtido o extrato seco (ES), de acordo com protocolo do Instituto Adolfo Lutz (Lutz, 1985).

### 2.11.6 Extrato seco reduzido

Para o cálculo do extrato seco reduzido (ESR) foi feita a subtração do valor de açúcares totais, quando este excede 1 g/L, do valor do extrato seco (ES), sendo assim:  $ESR = ATR (g/L) - ES (g/L)$  (Rizzon, 1996).

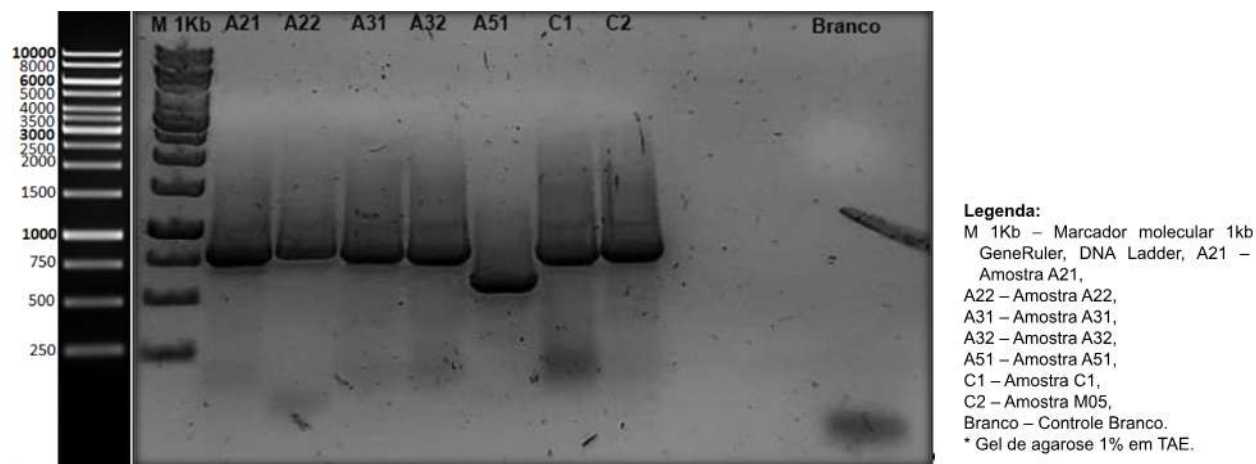
### 2.11.7 Cinzas

O teor de cinzas do mosto e do hidromel foi realizada por incineração em mufla a 550°C, segundo protocolo do Instituto Adolfo Lutz (Lutz, 1985).

## 2.12 Análise sensorial

Para avaliar as características sensoriais dos hidroméis produzidos, foram realizados os testes afetivos de aceitação, atitude e de preferência por ordenação, conforme metodologia descrita por Chaves e Sproesser (1993). Foram recrutados 100 avaliadores não treinados do sexo masculino e feminino, comprovadamente maiores de 18 anos, não gestantes e que não possuem qualquer restrição/alergia a bebidas alcoólicas e derivados de mel, estudantes, colaboradores celetistas ou terceirizados, da Instituição de Ensino superior – UNAERP *campus* Ribeirão Preto/SP - Brasil. Estes avaliadores foram convidados voluntariamente a participarem da análise sensorial e a eles foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), informando-lhes sobre os objetivos do projeto e orientando sua participação na análise. A avaliação sensorial do hidromel produzido foi realizada, no Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (Processo CAAE nº 63102222.6.0000.5498).

Os avaliadores aguardaram em local separado e foram convidados a adentrar a sala em grupos de três pessoas por vez, foram também orientados a se sentarem em locais distantes e demarcados dentro de uma sala climatizada. As amostras codificadas com algarismos de três dígitos foram servidas em copos plásticos e transparentes contendo aproximadamente 20 mL de hidromel, na temperatura aproximada de 5°C. Foram oferecidos água e biscoito do tipo salgado/água e sal a fim

**Figura 2:** Fragmentos de amplificação da região ITS e padrão do marcador utilizado.

de realizar a limpeza do palato entre as amostras, também foi oferecida uma amostra de café em grãos para neutralizar o aroma entre as amostras. As amostras de hidromel fornecidas foram identificadas como 310 que representa o hidromel fermentado pela levedura A31, assim como, a amostra 510 para levedura A51 e 050 para levedura M05.

Foi aplicada a ficha de análise sensorial, avaliando a aceitação, intenção de compra do produto e ordenação das amostras. Para avaliação de aceitação cada amostra foi julgada frente aos atributos aparência, aroma, sabor, teor alcoólico e impressão geral. Foi utilizada a escala hedônica verbal de 9 pontos de Peryam e Girardot (1952).

Para a avaliação de intenção de compra do produto hidromel foi utilizada a escala de cinco pontos descrita por Chaves e Sproesser (1993).

Quanto o teste de ordenação foi orientado aos participantes ranquear as amostras em primeiro (1) segundo (2) e terceiro (3) lugar, sendo número 1 para amostra que mais gostou e número 3 para que menos gostou.

Os resultados gerados foram compilados e submetidos à análise estatísticas. Os dados coletados, no teste de aceitação, foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA, 2006), utilizando como fontes de variação as amostras e os julgadores. Todos os resultados expressos em média foram comparados quanto a sua significância estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância (Dutcosky, 2011). Os dados do teste de intenção de compra foram avaliados pelas frequências através dos gráficos de histogramas. Os resultados do teste afetivo de preferência por ordenação foram analisados por meio de estatística não-paramétrica, utilizando o teste de Friedman, conforme indicado por

Dutcosky (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Seleção e identificação de leveduras

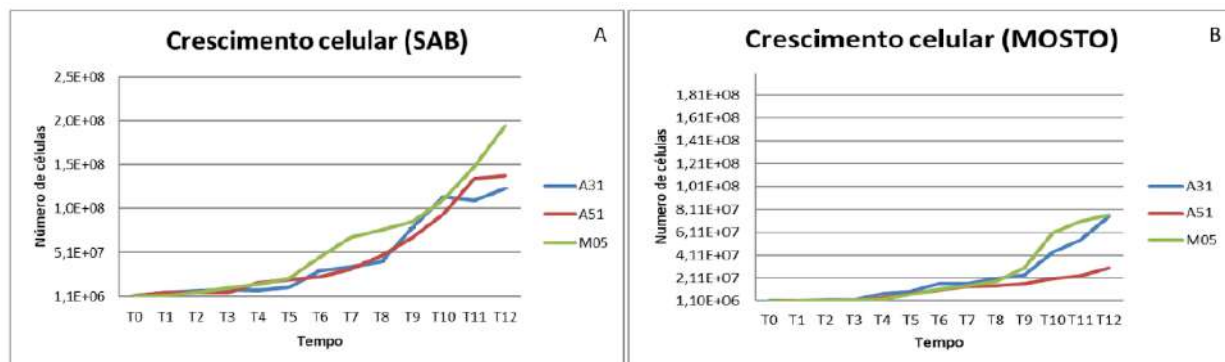
O isolamento de leveduras se deu a partir de mel *in natura* e de resíduos de hidromel provenientes de produção artesanal. As amostras de leveduras A21, A22, A31 e A32 foram isoladas da lama de hidromel, enquanto a amostra A51 foi isolada de mel *in natura*. As leveduras comerciais foram denominadas amostras C1 e C2, sendo C1 fermento culinário da marca Fleischmann® e C2 levedura comercial para produção de hidromel M05 da empresa Jack Magroves®.

Após extração de DNA das amostras a região ITS foi amplificada e os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose. A amplificação da região ITS das amostras A21, A22, A31, A32, C1 e C2 exibem produto de amplificação de aproximadamente 750 pb, compatível com o tamanho esperado para *Saccharomyces cerevisiae* (C1 - Fleischmann®). A amostra A51 apresenta um produto de amplificação de aproximadamente 600 pb indicando tratar-se de outra espécie ou gênero de levedura (Figura 2).

Após sequenciamento dos produtos de amplificação, as sequências obtidas foram editadas utilizando o programa *Chromas*, com a finalidade de garantir melhor qualidade e precisão da análise. Os arquivos gerados foram comparados com sequências depositadas no *GenBank*, as amostras A21, A22, A31, M05 obtiveram similaridades da região ITS acima de 85% para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a amostra A51 obteve 100% de similaridade para a espécie *Rhodotula mucilaginosa*. A partir dos resultados preliminares



Figura 3: Crescimento celular em meio de cultura Sabouraud e mosto.



foram selecionadas 3 amostras, sendo duas pertencentes ao gênero *Saccharomyces*: amostra A31 isolada de resíduos de hidromel e amostra M05 proveniente de cepa comercial selecionada para hidromel, e uma amostra do gênero *Rhodotorula* (A51).

### 3.2 Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi obtida a partir da leitura de absorbância e contagem de células viáveis, de cada alíquota coletada de hora em hora pelo período de 12 horas e podem ser observadas nos gráficos 1A e 1B.

A levedura *Saccharomyces* proveniente de cepa comercial específica para produção de hidromel apresentou velocidade de multiplicação superior quando comparada com demais amostras em ambos cenários, enquanto a levedura selvagem (A51) isolada de mel obteve o menor desempenho de crescimento. Os resultados apontam que em 12 horas de fermentação em mosto, as leveduras tiveram um crescimento de  $8,0 \times 10^7$  células/mL, enquanto no meio de cultura (SAB) essa mesma quantidade celular pode ser observada entre o 8 e 9 horas de incubação (Gráficos 1A e 1B).

A grande diferença em se trabalhar com meios de cultura quimicamente definidos (SAB) e um meio complexo (Mosto diluído) é que neste último, por não ser conhecidas as concentrações dos constituintes presentes no meio, a taxa de multiplicação dos microrganismos alvo bem como a reprodutibilidade da velocidade de crescimento dos mesmos, não segue um padrão. O que é facilmente estabelecido em meios comercialmente definidos (Ceccato-Antonini, 2010).

Nas condições dos ensaios, independente da taxa de multiplicação celular diferencial, observou-se que as leveduras foram capazes de multiplicarem-se no mosto (mel e água) sem necessidade de suplementação nutricional, quimicamente definida, além dos elementos contidos no próprio mel.

### 3.3 Processo fermentativo

Durante a primeira semana, observou-se a maior variação do °Brix, como indicativo de uma maior atividade fermentativa no período. A partir do consumo dos nutrientes disponíveis a variação diminuiu até sua estabilidade que ocorre após a terceira semana, o que sugere o final da atividade fermentativa das amostras. As cepas analisadas demonstram comportamento semelhante entre si, sinalizando que todas as cepas estudadas apresentam capacidade de assimilar os sólidos solúveis presentes do mosto.

Ao final da fermentação, o líquido foi separado do sedimento e o hidromel passou por um período de maturação que inclui a clarificação, processo necessário para que haja a total decantação das leveduras e a sedimentação das partículas em suspensão. O hidromel foi mantido em recipientes de vidro hermeticamente fechados na temperatura de 4°C durante 30 dias, após a total decantação dos sedimentos foi realizada a tráfega do hidromel para garrafas de vidro verde, armazenados em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

### 3.4 Caracterização físico-química do Hidromel

A caracterização físico química de bebidas fermentadas é fundamental para a determinação de sua identidade e qualidade, sendo os principais parâmetros a densidade, o teor alcoólico, a acidez total e volátil e os açúcares redutores (Mileski, 2016). O resultado obtido na caracterização físico química e o padrão permitido pela legislação vigente são apresentados na tabela 1

Os valores de pH variaram entre 4,30 e 4,10, o que possibilita maior resistência a possíveis contaminações microbiológicas. (Pereira *et al.*, 2009) apresentou valores de pH para hidromel na faixa de 3,8 a 4,9. Apesar das diferenças observadas, não foi possível comparar com as normas, visto a inexistência de padrão para este



**Quadro 1:** Caracterização físico-química dos hidroméis produzidos com diferentes cepas de leveduras.

Parâmetros	Padrão	Amostra A31	Amostra A51	Amostra M05
pH	Não determinado	4,15	4,10	4,30
Sólidos solúveis °Brix	Não determinado	17 °Brix	17 °Brix	17 °Brix
Teor de açúcar em g/L	Abaixo de 3 g/L (Seco)	6,58 g/L	6,56 g/L	6,60 g/L
Gradação alcoólica, em % v/v a 20 °C	4 – 14 %	14,18 %	14,04 %	14,16 %
Extrato seco reduzido, em g/L	Limite mínimo 7 g/L	96,78 g/L	97,05 g/L	98,13 g/L
Cinzas, em g/L	Limite mínimo 1,5 g/L	4,9 g/L	4,3 g/L	5,0 g/L

Fonte: Autora e Brasil (2012). Os resultados são as médias de três repetições.

parâmetro.

Os hidroméis produzidos apresentaram gradação alcoólica de 14,04% a 14,18% estando assim ligeiramente acima do limiar superior dos parâmetros permitidos por legislação (4 a 14%) (Brasil, 2012). Gomes (2015) também utilizaram mosto a 30 °Brix inicial, e observaram que leveduras comerciais foram capazes de produzir 5,9% (v/v) de etanol. Gupta e Sharma também relataram valores de 4,6 e 11,8% (v/v) de etanol em hidroméis com 8,2 e 13 °Brix finais respectivamente (Gupta; Sharma, 2009).

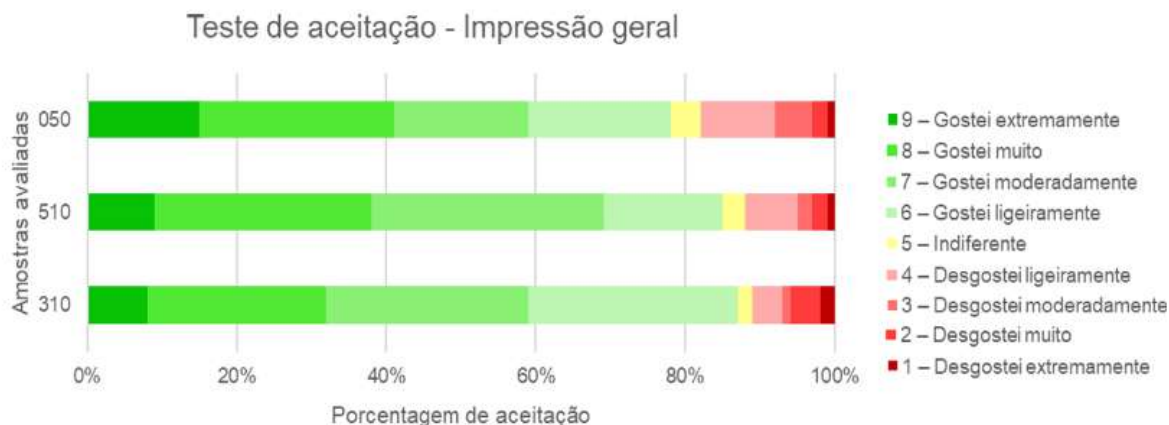
Os açúcares redutores totais (ART) foram dosados durante a fermentação e no produto final, para as análises foi necessária a construção da curva padrão através de soluções de glicose nas concentrações de 2 g/L a 0,05 g/L, a partir da curva se obteve a equação da reta como sendo:  $y = 1,5229x - 0,141$ , com coeficiente de determinação  $r^2 = 0,9913$ . A curva obtida apresentou linearidade ( $r = 9956$ ) o que atende aos critérios resolutivos de validação uma vez que a RDC nº 166/2017, preconiza valores superiores a 0,99 como aceitáveis à validação analítica de linearidade nas concentrações analisadas na faixa de trabalho determinada (ANVISA, 2017).

Inicialmente, o mosto apresentava 22,77 g/L de ART, enquanto o hidromel produzido apresentou uma variação de ART residuais de 6,56 a 6,60 g/L, esses açúcares presentes ao final da fermentação são responsáveis pelo dulçor final da bebida.

Segundo a legislação brasileira para hidromel Brasil (2012), pode se classificar o hidromel em suave, quando apresentam teor de açúcares acima de 3 g/L, e secos quando inferior. Sendo assim, os hidroméis produzidos no estudo foram classificados como suave. Todas as

amostras de hidroméis produzidos estão de acordo com os parâmetros preconizados pela legislação. Ademais, análises comparativas das amostras quanto aos aspectos de aroma e sabor do produto podem ser interessantes para a escolha de um hidromel que agrade o mercado consumidor.

O extrato seco (ES) é um parâmetro que está relacionado com a estrutura e o corpo de bebidas alcoólicas, em vinhos podemos classificar aqueles com menos de 20 g/L de extrato são considerados leves e, acima de 25 g/L, encorpados (Rizzon, 1996). O ES é constituído por ácidos, sais, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, açúcares e polissacarídeos. Através do ES podemos calcular o teor de extrato seco reduzido (ESR) pela subtração do valor de açúcares totais, quando este excede 1g/L, do valor do extrato seco total (Brunelli; Iamizun; Filho, 2017). A legislação brasileira para hidromel preconiza que os hidroméis apresentem uma concentração de ESR no mínimo de 7 g/L, sendo assim, o presente estudo se encontra dentro dos parâmetros por apresentar ESR acima de 96,78 g/L (Brasil, 2012). O parâmetro de cinzas expressa o teor de resíduos minerais fixos, em sua maioria minerais derivados da matéria prima do mel como o potássio, cálcio, magnésio, sódio, enxofre, fósforo entre outros. Estudos indicam que os méis escuros apresentam maior conteúdo de cinzas quando comparados com méis claros (Lascave; Gonnet; Bogdanov; al., 2008). Os resultados do presente estudo demonstraram valores de cinzas de 4,3 a 5,0 g/L estando de acordo com os parâmetros de identidade e qualidade do hidromel segundo legislação (Brasil, 2012).

**Figura 4:** Distribuição das notas da escala hedônica para impressão geral.

### 3.5 Análise sensorial

Ao analisar a categoria impressão geral do produto (Gráfico 2), foi constatado que aproximadamente 80% dos avaliadores julgaram o produto com notas entre 6 e 9, o que indica níveis de satisfação que variam de "gostei ligeiramente" a "gostei extremamente". Embora a amostra 050 tenha apresentado uma porcentagem menor de níveis de gostei, ela se destacou por ter obtido a maior número de avaliações de "gostei extremamente" (9). Entretanto, apesar da aceitação do produto pelos possíveis consumidores, as diferenças entre as amostras não foram consideradas significativas segundo ANOVA (2006),  $p > 0,05$ .

Aproximadamente 70% dos participantes, experimentaram o produto pela primeira vez, destes, 61% apresentam intenção de compra. Enquanto do total, 66% dos avaliadores apresentaram intenções de compra do hidromel, e apenas 8% afirmaram que não comprariam o produto. Esses resultados sugerem que embora o hidromel seja um produto pouco conhecido, apresenta um grande potencial de mercado consumidor.

No teste de preferência, os avaliadores foram solicitados a classificar as três amostras simultaneamente, de acordo com sua preferência, usando a escala de 1 (para a amostra mais preferida), 2 (para a amostra intermediária) e 3 (para a amostra menos preferida). A análise dos resultados foi realizada por meio do teste não paramétrico de Friedman, para determinar se houve diferença significativa entre as amostras. A diferença entre as somas das classificações foi menor que o valor crítico tabelado, indicando que não houve diferença significativa entre as amostras no nível de significância de 5%.

A distribuição das classificações apontou que 44% dos avaliadores classificaram a amostra 050 como a

mais preferida, enquanto 29% definiu a amostra 510 como a de maior preferência e 27% julgou a amostra 310 como preferida. Do que nos foi possível buscar na literatura, não há relatos de estudos que tenham realizado análise sensorial de hidromel produzido exclusivamente a partir da fermentação de mel silvestre e água, isento de suplementação nutricional. Os três trabalhos encontrados (Brunelli; Orsi; Filho, 2016), obtiveram hidroméis a partir de mel de eucalipto, laranjeira, silvestre, ou ainda receberam a adição de açúcar e fruta (morango). Deste modo, os resultados disponíveis na literatura, até o momento, são incomparáveis com os obtidos neste trabalho.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos delineados neste estudo foram alcançados com êxito. As leveduras presentes em resíduos de hidromel e amostras de mel, foram isoladas e identificadas. Os hidroméis produzidos por esses microrganismos, através de um processo fermentativo simples, foram caracterizados físico-quimicamente e as amostras de hidromel produzidas estão em conformidade com os parâmetros regulatórios.

A receptividade do produto por potenciais consumidores foi avaliada. Observamos que, embora o mercado demonstre receptividade e intenção de compra em relação ao hidromel produzido, ainda há uma lacuna perceptível entre os potenciais consumidores quanto à apreciação das nuances sensoriais resultantes das diferentes leveduras utilizadas no processo de fermentação. A capacidade de distinguir e valorizar tais variações não está plenamente desenvolvida no público consumidor, indicando uma necessidade de familiarização com os diversos perfis de sabor e aroma proporcionados por ce-

pas de leveduras distintas. Deste modo, a produção de hidromel emerge como uma oportunidade promissora para os pequenos produtores de mel.

A escolha de leveduras comerciais pode representar uma estratégia interessante para os pequenos produtores, permitindo-lhes oferecer produtos consistentes e previsíveis, capazes de atender às expectativas do mercado em termos de qualidade e padronização.

A disseminação de conhecimento sobre técnicas de fermentação e a oferta de cepas de leveduras comerciais acessíveis podem contribuir significativamente para o desenvolvimento deste segmento. Ademais, é fundamental promover capacitações e disponibilizar recursos que facilitem a incorporação dessas práticas em suas atividades. Em síntese, a produção de hidromel representa não apenas uma alternativa lucrativa para os produtores de mel, mas também uma oportunidade para a diversificação e enriquecimento do mercado de bebidas fermentadas, proporcionando experiências sensoriais distintas aos consumidores.

Estudos futuros, poderão disponibilizar aos pequenos produtores acesso a novas linhagens fermentadoras do mosto de mel silvestre e, a presença de leveduras não-*Saccharomyces*, como a *Rhodotorula*, na microbiota do mel, oferece novas perspectivas para a diversificação e expansão do mercado de bebidas fermentadas.

## 5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Professor Dr. André Luis Dias e ao Responsável Técnico Dr. Jean Carlos Rodrigues da Silva, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo *Campus Sertãozinho*, Laboratório do Centro multidisciplinar de tecnologia cervejeira, pelo auxílio nas análises do teor alcoólicos dos hidroméis produzidos.

## REFERÊNCIAS

- ANALYTICA - EBC. **Alcohol in Beer by Near Infrared Spectroscopy**. São Paulo, SP, 2008. Versão 9.2.6.
- ANOVA. Sidney Siegel and N. John Castellan Jr. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166/2017**: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Florianópolis, SC, 2017. Disponível em: <https://x.gd/C8gol>.
- BOGDANOV, S.; AL. et. Honey for nutrition and health: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 677–689, 2008.
- Brasil. **Instrução Normativa MAPA nº 34**, de 29/11/2012. Brasília, 2012.
- BRUNELLI, L. T.; IAMIZUN, V. M.; FILHO, W. G. V. Caracterização físico-química, energética e sensorial de hidromel produzido a partir de cinco tipos de leveduras alcoólicas. **Revista Energia na Agricultura**, v. 32, n. 2, 2017.
- BRUNELLI, L. T.; ORSI, R. d. O.; FILHO, W. G. V. Hidromel. In: FILHO, W. G. V. (Ed.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016. p. 162–181.
- CARVALHO, M. e. a. Yeast species associated with honey: different identification methods. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 103–113, 2010.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. São Carlos: EdUFSCar, 2010. 105 p. ISBN 978-85-7600-222-2.
- CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas**. 1. ed. Viçosa, MG: UFV, 1993. v. 1.
- CHEN, Y.-C. e. a. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 dna sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4042–4051, 2001.
- DEMETS, G. J. **O Hidromel**: Sobre a sua origem, Variedade, e a Maneira de Prepará-lo. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Editora MEAD HALL, 2020.
- DENISE, F. **Hidromel à moda brasileira**. 2016. Disponível em: <https://www.otempo.com.br/gastro/hidromel>. Acesso em: 24 out. 2024.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 3. ed. Curitiba: Champagnat, 2011. v. 1.
- FERNANDES DENISE, L. G. O. S. S. L. Avaliação de diferentes estirpes da levedura *saccharomyces cerevisiae* na produção de hidromel, utilizando méis residuais do processo de extração. **Evidência**, v. 9, n. 1-2, p. 29–42, 2009.
- GOMES, T. e. a. Influence of sweetness and ethanol content on mead acceptability. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, 2015.

- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. ISBN 978-1-936113-42-2.
- GUPTA, J. K.; SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. 2009.
- IGLESIAS, A. e. a. Comprehensive study of honey with protected denomination of origin and contribution to the enhancement of legal specifications. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8561–8577, 2012.
- IGLESIAS, A. e. a. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12577–12590, 2014.
- LASCEVE, G.; GONNET, M. Radioactivation analysis of the mineral content of a honey. possibility of precisising the geographic origin. **Apidologie**, v. 5, no. 3.
- LAWLESS, H. T. *et al.* **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Springer, 2010.
- LUTZ, A. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 2.
- MCGOVERN, P. E. *et al.* Fermented beverages of pre-and proto-historic china. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 2004.
- 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, n. 1, p. 193–198, 2010.
- MILESKE, J. P. F. **Produção e caracterização de hidromel utilizando diferentes cepas de leveduras Saccharomyces**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Sambrook, Joseph and Russell, David W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1-3. ISBN 978-0879695774.
- NAKADA LIDIA URBANO CACIATORI, M. A. C. P. J. P. Viabilidade da implantação de uma indústria produtora de hidromel. **Revista Interface Tecnológica**, v. 17, n. 1, p. 431–443, 2020.
- OLIVEIRA, L. M. *et al.* Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **Geoambiente on-line**, n. 19, p. 1–23, 2012.
- PEREIRA, A.; OLIVEIRA, J.; MENDES-FERREIRA, A.; ESTEVINHO, L.; MENDES-FAIA, A. 14 - mead and other fermented beverages. In: PANDEY, A.; SANROMÁN, M. Á.; DU, G.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C.-G. (Ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 407–434. ISBN 978-0-444-63666-9.
- PEREIRA, A. P. *et al.* Mead production: Selection and characterization assays of *saccharomyces cerevisiae* strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2057–2063, 2009.
- PERYAM, D. R.; GIRARDOT, N. F. Qm advanced taste-test method. **Food Engineering**, v. 24, p. 59, July 1952.
- RAMALHOSA, E. *et al.* Mead production: Tradition versus modernity. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 63, p. 101–118, 2011.
- RIZZON, A. M. L. A. Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. **Ciência Rural**, v. 26, p. 297–300, 1996.
- ROSA, D. D. *et al.* Análise filogenética de *phytophthora capsici* leonian do estado de são paulo baseada na sequência de nucleotídeos da região its-5.8 s rDNA. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 429–434, 2003.
- SANGER, F. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTOS, A. A. dos *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reativo dns em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.
- SANTOS KELI CRISTINA, S. G. V. D. S. A. A. C. M. D. Avaliação do conhecimento e do interesse por hidromel: uma pesquisa de mercado com consumidores da região sul do Brasil. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 83–92, 2021.

SIMÃO, L.; WANDERLEY, B. R. da S. M.; NUNES, I. L.; FRITZEN-FREIRE, C. B. Prospecção tecnológica de patentes sobre hidromel: panorama atual e perspectivas futuras. **Cadernos de Prospecção**, v. 15, n. 3, p. 912–928, 2022.

STEINKRAUS, R. A. M. K. H. Factors influencing the fermentation of honey in mead production. **Journal of Apicultural Research**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 1966.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **ActGene – Laboratório de Biologia Molecular**. 2003. Disponível em: <https://actgene.com.br/>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego, CA: Academic Press, 1990. p. 315–322. ISBN 978-0-12-372180-8.