



Jornadas de LÚPULO e CERVEJA

Novas oportunidades de negócio

Livro de atas

Bragança, 13-14-15 de julho 2015

editores

Manuel Ângelo Rodrigues · Jorge Sá Morais · João Paulo Miranda de Castro

organização



ipb

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Centro de Investigação de Montanha



Jornadas de LÚPULO e CERVEJA

Novas oportunidades de negócio

Livro de atas

Bragança, 13-14-15 de julho 2015

editores

Manuel Ângelo Rodrigues · Jorge Sá Morais · João Paulo Miranda de Castro

organização



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Centro de Investigação de Montanha



Título: Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio.
Livro de atas

Editores: Manuel Ângelo Rodrigues (CIMO/IPB9)
Jorge Sá Morais (ESA/IPB)
João Paulo Miranda de Castro (CIMO/IPB)

Organização: Instituto Politécnico de Bragança
ISBN: 978-972-745-202-6
Handle: <http://hdl.handle.net/10198/11625>

Edição: Instituto Politécnico de Bragança – Dezembro de 2015

Design da capa: Serviços de Imagem do IPB

Contacto: jpmc@ipb.pt

Apoios:



Conteúdo:

<u>O LÚPULO: DA CULTURA AO EXTRATO. TÉCNICA CULTURAL TRADICIONAL</u>	<u>1</u>
<u>O LÚPULO: CULTIVARES E EXTRATO</u>	<u>11</u>
<u>PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DE CEREAIS: NOTAS BREVES SOBRE O CULTIVO DE CEVADA EM PORTUGAL</u>	<u>23</u>
<u>PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DE CEREAIS: PROCESSO DE MALTAGEM DA CEVADA</u>	<u>37</u>
<u>LEVEDURAS E FERMENTAÇÕES: O CASO DA CERVEJA</u>	<u>53</u>
<u>A CULTURA DO LÚPULO EM BRAGANÇA. ASPETOS AGRONÓMICOS INOVADORES E POTENCIAL E EXPANSÃO</u>	<u>63</u>
<u>OBTENÇÃO DE PLANTAS DE <i>HUMULUS LUPULUS</i> L. RESISTENTES A VÍRUS</u>	<u>71</u>
<u>MACROZONAGEM DA APTIDÃO DO SOLO PARA A CULTURA DO LÚPULO NO DISTRITO DE BRAGANÇA</u>	<u>83</u>
<u>UM FUTURO PARA A PRODUÇÃO DE LÚPULO EM PORTUGAL</u>	<u>99</u>
<u>LÚPULO: APLICACIÓN INDUSTRIAL DE LA TECNOLOGÍA DE GASES COMPRIMIDOS.</u>	<u>101</u>

O lúpulo: da cultura ao extrato. Técnica cultural tradicional

M Ângelo Rodrigues¹, Jorge Sá Morais², João Paulo Castro¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

²Unidade de Química Analítica – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

Este trabalho consiste numa breve revisão sobre a cultura do lúpulo em Portugal, com incidência na técnica cultural tradicional. Faz-se um breve apontamento histórico sobre a cultura do lúpulo, em particular do desenvolvimento inicial da cultura em Portugal. Segue-se uma descrição sumária dos principais aspetos botânicos da planta e da sua adaptação ecológica. Na descrição da técnica cultural tentam destacar-se aspetos importantes como instalação da cultura, fertilização, poda, rega, proteção sanitária e colheita.

Palavras-chave: adaptação ecológica; aspetos botânicos; *Humulus lupulus*; técnica cultural

Breve apontamento histórico sobre a cultura do lúpulo

O lúpulo cultivado destina-se sobretudo à utilização na indústria cervejeira. O uso de lúpulo no fabrico de cerveja deve-se à existência nas flores femininas de uma substância, vulgarmente designada de lupulina, que confere o gosto amargo e o sabor à cerveja. O lúpulo é também utilizado como planta medicinal, sendo incorporado em medicamentos recomendados para insónia, stresse e ansiedade. Os rebentos enquanto jovens são comestíveis e os caules podem ser usados no fabrico de pasta de papel e como fibra têxtil. Em Portugal, o lúpulo cultivado destina-se exclusivamente ao fabrico de cerveja.

O lúpulo como cultura de reconhecimento mundial surgiu na Alemanha no século IX, embora seja utilizado no fabrico de cerveja no Cáucaso desde tempos pré-históricos (Rybacek, 1991). Em Portugal, apesar do lúpulo ser uma espécie espontânea, o cultivo com significado económico iniciou-se em 1962 em Bragança (Carmona, 1982). O material vegetativo e o essencial da técnica cultural foram importados de Espanha. Em 1963 foi constituída a Lupulex (Sociedade Portuguesa de Cultura de Lúpulo), uma sociedade com capital da indústria cervejeira Nacional. Entre 1963 e 1968 decorreram

ensaios de adaptação da cultura pelo Norte e Centro do país e também na região dos Açores. Com base nos resultados destes ensaios de adaptação decretou-se em 1966 (Decreto-Lei 47011, de 16 de maio) que, por questões de qualidade, o lúpulo só poderia ser cultivado nas zonas de Braga e Bragança. Os primeiros anos do cultivo do lúpulo em Portugal encontram-se descritos em detalhe em Almeida (1981) e Pereira (1981).

A instalação da cultura foi rápida e, até meados da década de 1970, os resultados foram excepcionais existindo grande euforia em torno da cultura. Em 1976 atingiu-se uma área de cultivo de 205,8 ha e uma produção de 438,1 t no total Nacional (Patrício, 1995). Portugal foi exportador de lúpulo, uma vez que a produção Nacional ultrapassava as necessidades da indústria cervejeira portuguesa. A partir de 1978/79 começam a surgir os primeiros problemas. Ocorrem quebras de produção, provavelmente motivadas por maus anos agrícolas, problemas sanitários, nutricionais, de compactação do solo, etc. (Pereira, 1981). A conjuntura dos mercados internacionais também se deteriorou, com estagnação dos preços de venda do lúpulo e forte aumento dos fatores de produção. Em 1990 acaba a Lupulex. As cervejeiras nacionais deixam de assegurar o escoamento da produção. Em 1991 foi criada a Bralúpulo (Associação de Produtores de Lúpulo de Bragança e Braga) para fazer face à extinção da Lupulex. A partir desta data, o setor produtivo reestruturou-se e os campos foram plantados com a cultivar Nugget (anteriormente cultivou-se sobretudo a cultivar Brewers Gold) que é mais rica em ácidos α , o componente das cultivares amargas que mais valoriza o lúpulo face à indústria cervejeira. No presente, encontram-se em produção duas explorações agrícolas, que cultivam uma área total aproximada de 12 ha.

No contexto internacional Estados Unidos e Alemanha são os maiores produtores, seguidos de Etiópia, China e República Checa (Figura 1). Por continente, a Europa lidera com 39,8% da produção mundial, seguida de Américas com 25,7%, África com 20,1%, Ásia com 12,8%) e Oceânia com 1,6% (Figura 2). A produção mundial de lúpulo tem vindo a registar uma tendência de ligeiro decréscimo, sendo mais pronunciado em outras partes do mundo que na Europa. Contudo, em 2013, último ano para o qual a FAO já disponibilizou estatísticas, a produção na Europa foi particularmente baixa.

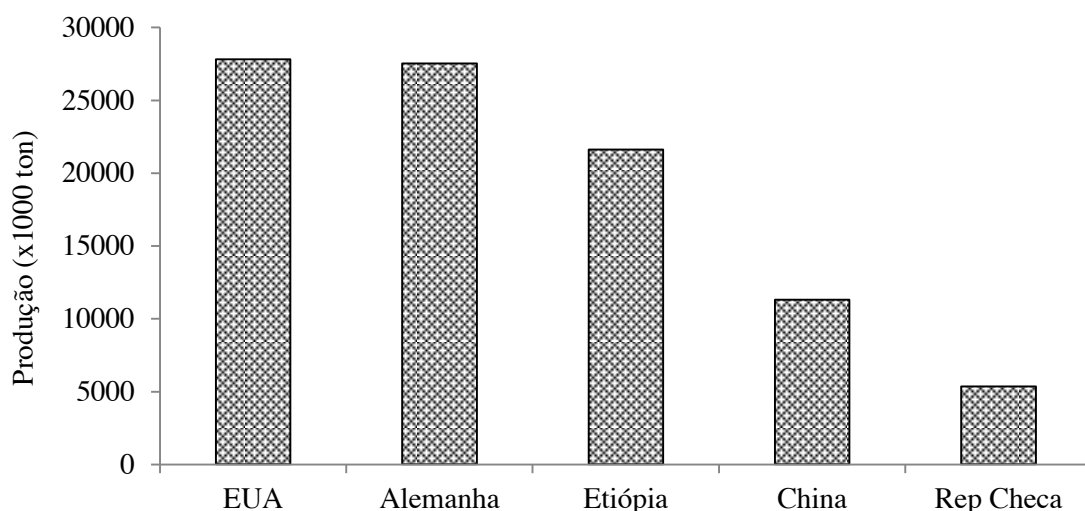


Figura 1. Produção de lúpulo em 2013 nos cinco maiores produtores mundiais (FAO, 2015).

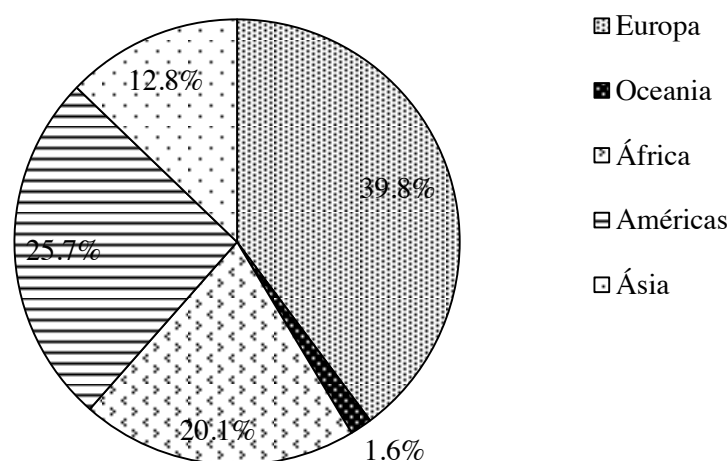


Figura 2. Produção de lúpulo em 2013 por continente (FAO, 2015)

Classificação botânica e aspetos morfológicos da planta

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) pertence à família Cannabaceae. É uma planta perene (perde a parte aérea durante o Inverno), de caule volúvel, dióica (surgem plantas femininas e masculinas) e com idade económica de cultivo superior a 20 anos.

A parte subterrânea é constituída por uma estrutura perene, composta de raízes que podem atingir elevada profundidade, raízes especializadas na acumulação de reservas e raízes anuais emitidas a partir da estrutura perene ou da base dos sarmentos. A planta

apresenta caules trepadores (sarmentos) que crescem até 8 m de altura em menos de 3 meses. Rebentam anualmente em número de 20 a 40, dependendo do vigor da planta, a partir da parte perene subterrânea. Na fase inicial são de consistência herbácea, de forma tendencialmente hexagonal e movimento de enrolamento dextrogiro. As folhas surgem de forma oposta nos nós. São pentalobuladas na base, trilobuladas na parte média e inteiras na parte superior. Os bordos são serrados e apresentam-se pubescentes na página inferior. As inflorescências masculinas são panículas, enquanto as masculinas são espigas curtas, vulgarmente designadas cones. As espigas apresentam uma ráquis central e brácteas e bractéolas a proteger a flor. Os grânulos de lupulina encontram-se na base das bractéolas. Os frutos são aquênios (nas plantações comerciais não devem aparecer pois cultivam-se apenas plantas femininas). Para maior detalhe dos aspetos morfológicos da planta pode consultar-se Rybáček (1991). A Figura 3 mostra o aspeto de um campo de cultivo, as inflorescências femininas e as bractéolas exibindo os grânulos de lupulina.

Na região de Bragança a planta (cultivar Nugget) inicia o ciclo biológico com a rebentação dos sarmentos a partir do fim de março sendo a colheita efetuada a partir dos últimos dias de agosto e prolongando-se pelo mês de setembro.

Adaptação ecológica

O lúpulo necessita de vernalização (exposição ao frio durante o período repouso). O zero vegetativo deve estar próximo de 8°C. Para completar o ciclo a soma das temperaturas médias das máximas deve estar entre 2500 a 3000 °C. A temperatura média anual mais favorável deve estar próxima de 8 a 10 °C, embora algumas cultivares de lúpulo sejam cultivadas com grande sucesso em regiões com valores de temperatura média anual bastante superiores. O crescimento cessa a temperaturas superiores a 32°C. Informação mais detalhada sobre as exigências térmicas da cultura pode ser consultada em Rybáček, (1991).

A insolação parece ser um fator de produtividade muito importante. A duração da insolação deve estar entre 1800 a 2000 h. Em Portugal, verificou-se haver uma boa relação entre a insolação do mês de junho e a produção de lúpulo (Trigueiro e Vasconcelos, 1981).

O lúpulo espontâneo surge próximo de cursos de água, onde o solo apresenta humidade ao longo de todo o Verão. Em Portugal o cultivo é apenas possível em regadio. Neste sentido, a precipitação tem baixo significado ecológico.



Figura 3. Aspeto de um campo de lúpulo a meio da estação de crescimento (em cima), inflorescências femininas ou cones (em baixo à esquerda) e grânulos de lupulina na base das bractéolas (em baixo à direita).

Os solos devem ser naturalmente férteis. Algumas das principais características favoráveis são espessura efetiva elevada, bom arejamento (dependente da textura, estrutura e teor de matéria orgânica), pH próximo da neutralidade e teor de matéria orgânica elevado (Navarro et al., 1982). Contudo, profundidade e textura são os aspetos mais determinantes uma vez que os restantes podem ser modificados pela técnica cultural.

Técnica cultural

A preparação do campo antes da instalação é uma etapa importante nesta cultura, tendo em conta que se trata de uma espécie perene que pode estar em cultivo por mais de 20 anos. O solo deve ser subsolado para facilitar o estabelecimento do sistema radicular em profundidade. Pode haver necessidade de fazer nivelamento, uma vez que na técnica cultural tradicional se utiliza rega por alagamento. Se o terreno acumular água em excesso durante o Inverno deve ser sujeito a obras de drenagem. É frequente na fase de preparação do solo aplicarem-se corretivos alcalinizantes, quando a acidez do solo o justifique, e também matéria orgânica. Se a forma da folha o permitir, a colocação dos postes e toda a armação do terreno para suporte das plantas deve ter em conta que a melhor orientação das plantas é no sentido Norte-Sul (melhora a repartição da radiação no coberto).

Na plantação normalmente tem-se como referência o uso de compassos de 2,8 m x 1,4 m (2550 plantas/ha) e 2,8 m x 0,7 m (5100 plantas/ha). Na primeira situação, programa-se puxar dois fios por planta e na segunda apenas um. O mais importante contudo é a distância na entrelinha que deve estar ajustada ao tipo de mecanização que se vai implementar. Com o uso de mais plantas incrementam-se os custos de instalação, mas reduz-se o número de falhas de plantas no campo e pode originar-se uma distribuição mais homogénea do coberto. Com menos plantas reduzem-se substancialmente os custos de plantação. Contudo, do ponto de vista fisiológico o que se revela mais decisivo na produtividade é o número de sarmentos que se põe a trepar por unidade de área (Rybáček, 1991).

O lúpulo é uma planta de elevadas necessidades nutricionais devido à enorme canópia que desenvolve. Como já se referiu, deve ser cultivado em solos com pH próximo da neutralidade. O facto dos solos das regiões onde se cultiva lúpulo em Portugal serem normalmente ácidos faz com que seja habitual a necessidade de aplicar corretivos alcalinizantes. Em Portugal, já foi diagnosticada carência de magnésio em campos de lúpulo (Costa e Dias, 1981; Costa, 1982), pelo que, quando se pretenda corrigir o solo, se recomende a utilização de calcários magnesianos. O uso de matéria orgânica é considerado de elevada importância na cultura do lúpulo, tendo em conta a necessidade de os solos serem bem arejados e aos riscos de carência de micronutrientes. É também necessário ter em conta que as inúmeras mobilizações previstas na técnica cultural são muito agressivas para a estrutura do solo, podendo a matéria orgânica ter um efeito regenerador da sua estrutura e restantes propriedades físicas. O lúpulo é uma cultura de

elevada exportação de nutrientes. É frequente aplicarem-se 180 a 200 kg N ha⁻¹, 50 a 100 kg P₂O₅ ha⁻¹, 100 a 200 kg K₂O ha⁻¹ e 40 kg MgO ha⁻¹. Faz-se uma adubação de fundo com um terço do azoto necessário e a totalidade de fósforo e potássio e depois duas a três adubações de cobertura, inicialmente com nitrato de amónio (por vezes nitromagnésios) e na fase final nitrato de cálcio.

A poda realiza-se normalmente entre o fim de março e início de abril. É precedida de descava e limpeza das socas. Tradicionalmente podava-se com facas ou foices fazendo-se um trabalho metuculoso. Atualmente poda-se mecanicamente com equipamentos de discos. Pode fazer-se uma poda mais alta (em plantas novas, com menor capacidade de emitir rebentos) ou mais baixa (à rasa) em plantas mais velhas. Na prática fica apenas o sistema radicular perene e a soca (estrutura subterrânea de onde é emitida a maior parte dos novos sarmentos).

Quando surgem falhas de plantas no campo é necessário fazer a retancla. Pode usar-se material da poda ou, mais frequentemente, puxa-se apenas um fio de uma planta vizinha.

Quando as plantas têm 60 a 80 cm de altura é necessário colocá-las a trepar num fio de nylon que se liga de um fio colocado no solo ao longo da linha à estrutura de armação superior em arame. As plantas têm tendência natural para trepar mas nem todas encontram rapidamente o fio, pelo que têm tendência a enrolar-se umas às outras no solo. O auxílio na colocação das plantas a trepar é também importante porque permite seleccionar dois ou três sarmentos por fio. Escolhem-se os mais vigorosos e com a forma hexagonal. Os restantes são eliminados, normalmente com facas os foices. Esta planta enrola no sentido dos ponteiros do relógio. Ao longo da primavera é necessário continuar a eliminar os novos rebentos que se vão formando. No verão faz-se uma desfolha para melhor o arejamento da estrutura e reduzir a incidência de doenças e pragas. A desfolha pode ser manual ou através do uso de desfolhantes químicos. Na segunda situação usam-se herbicidas à base de diquato.

Na técnica de cultivo tradicional do lúpulo é efetuada a operação de amontoa duas a três vezes durante a estação de crescimento. A amontoa consiste em deslocar terra para junto das plantas, fazendo um camalhão. A primeira amontoa faz-se a seguir à poda para repor o solo que foi retirado, uma vez que esta foi precedida de descava. Faz-se uma segunda amontoa quando se vai iniciar a rega e as plantas têm aproximadamente 1m de altura. Por vezes faz-se ainda uma terceira amontoa para facilitar o estabelecimento do

sistema radicular anual a partir da base dos sarmentos do ano. Usam-se charruas vinhateiras ou charruas com aivecas descentradas.

Na cultura do lúpulo o solo é mobilizado várias vezes ao longo do ano. Faz-se no outono ou início da primavera para incorporar estrumes. Durante a estação de crescimento faz-se repetidamente para reduzir a compactação do solo e a formação da crosta superficial provocado pela rega à manta. Normalmente após duas passagens da água em cada espaço na entrelinha passa-se o escarificador para facilitar a infiltração da água. Estas mobilizações servem também para combater as infestantes.

O lúpulo tem elevadas necessidades em água. O seu cultivo em Portugal só é possível com elevada quantidade de água disponível para regadio. De uma maneira geral pode dizer-se que são necessários mais de 5000 m³ de água por hectare (Carrilho, 1981). Rega-se à manta inundando os espaços na entrelinha, pelo que se exigem campos com bom nivelamento. A rega à manta é de reduzida eficiência e contribui para a compactação do solo. Para reduzir a compactação do solo e necessidade de mobilizações, é habitual regar entrelinha sim entrelinha não e trocar na rega seguinte.

O lúpulo apresenta problemas sanitários de difícil controlo. Na técnica cultural tradicional aplicam-se 12 a 14 caldas (Almeida, 1981). As infestantes que surgem na entrelinha são controladas com as mobilizações frequentes que se realizam. Contudo, o controlo das infestantes no camalhão é mais difícil. As operações de amontoa auxiliam no combate às infestantes. Nas fases mais avançadas da cultura podem controlar-se com herbicidas de contacto efetuadas com o duplo objetivo de efetuar também a desfolha do lúpulo. A possibilidade de usar herbicidas de ação residual não tem sido equacionada em Portugal, embora seja usual em outros países (Rybáček, 1991). O oídio (*Sphaerotheca humuli*) e o míldio (*Pseudoperonospora humuli*) são as doenças mais importantes e que obrigam à aplicação regular com fungicidas. Na falta de fungicidas recomendados para esta cultura em Portugal, os produtores orientam-se pela gama de produtos recomendados para a vinha. Outras doenças potenciais são botritis (*Botrytis cinerea*) e esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*). As principais pragas são um afídio conhecido como piolho-do-lúpulo (*Phorodon humuli*) e o aranhaço vermelho (*Tetranychus urticae*). Ambas as pragas são de difícil combate e podem exigir vários tratamentos ao longo da estação de crescimento. Ilharco (1982) fez um excelente levantamento do problema do piolho-do-lúpulo em Bragança, dos hospedeiros alternativos e das medidas de combate.

A colheita faz-se a partir dos últimos dias de agosto e prolongam-se pelo mês de setembro. A colheita e separação das flores é um processo demorado. Cortam-se os

sarmentos a 1 m do solo e destacam-se da parte superior, fazendo-se o transporte em reboque para a máquina colhedora de flores que é estacionária. Na máquina há setores para a entrada das lianas, separação de flores e folhas dos caules, separação das folhas das flores com base na forma e densidade e saída das lianas. A Figura 4 reúne um conjunto de aspetos relevantes da técnica cultural incluindo o processo de separação das flores da planta.



Figura 4. Campo de lúpulo em fase avançada da colocação dos sarmentos a trepar (em cima à esquerda), rega à manta (em cima à direita), mobilização do solo para destruição de crosta superficial provocada pela rega (ao centro à esquerda), desfolha química (ao centro à direita), aplicação de tratamento fitossanitário (em baixo à esquerda) e ripagem das flores (em baixo á direita).

Posteriormente a flor é seca a 60 a 70 °C em fornos até 10 a 12 % de humidade. Depois de seca é prensada e armazenada em câmaras frigoríficas a 0°C. O extrato obtido das flores é preparado na Alemanha, o que representa um custo de produção elevado devido ao transporte.

Referências

- Almeida, M.J. 1981. Introdução à cultura do lúpulo em Portugal. 1as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- Carmona, M.E. 1982. O lúpulo na casa de Ricafé. 2as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Carrilho, F. 1981. Necessidades do lúpulo do ponto de vista do clima e trabalhos culturais. 1as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- Costa, A.S.V. 1982. Deficiências de magnésio e potássio na cultura do lúpulo. 2as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Costa, A.S.V., Dias, J.C.S. 1981. Notas sobre o estado de fertilidade dos solos de alguns campos de lúpulo do Minho e Trás-os-Montes. 1as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- FAO (2015). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália. Disponível em: [http:// faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org) (consulta em julho de 2015).
- Ilharco, F.A. 1982. Os níveis populacionais do piolho-do-lúpulo na região de Bragança. Indicadores da sua evolução. 2as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Navarro, J., Pereira, J., Carrilho, F., Bobone, A., Gil, J., Mendes, C. 1982. Considerações sobre a evolução da técnica cultural do lúpulo em Portugal. 2as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Patrício, M.G.R. 1995. A cultura do lúpulo em Portugal. Custos de reconversão varietal e análise financeira de um caso tipo. Trabalho de Fim de Curso, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- Pereira, J.S. 1981. Considerações acerca da cultura do lúpulo em Portugal. 1as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- Rybáček, V. 1991. Hop Production. Elsevier, New York.
- Trigueiro, J.J.B., Vasconcelos, M.A. 1981. Fatores climáticos: a sua influência na cultura do lúpulo. 1as Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.

O Lúpulo: Cultivares e Extrato

Jorge Sá Morais¹

¹Unidade de Química Analítica – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

O lúpulo (*Humulus lupulus*), distribui-se como planta cultivada, em duas faixas a nível mundial, uma no hemisfério Norte e outra no hemisfério Sul, sendo nestas latitudes cultivadas várias cultivares.

De toda a planta apenas são utilizadas as inflorescências, apresentando estas em função da cultivar, uma composição em ácidos alfa e em aromas própria destas. A principal utilização da inflorescência é na produção de cerveja, conferindo a esta o típico gosto amargo e aroma.

A incorporação na cerveja pode ser feita sobre a forma de vários produtos para além das próprias inflorescências (pellets, extrato).

Neste trabalho vamos apresentar resumidamente alguns destes aspectos sobre as cultivares e as inflorescências do lúpulo.

Palavras-chave: *Humulus lupulus*; cultivares; inflorescências; ácidos alfa; pellets; extrato.

Introdução

Portugal encontra-se dentro da faixa de latitude Norte considerada óptima para a produção de lúpulo. A cultivar existente em produção neste momento e com uma área de 12 ha, é a Nugget (cultivar de origem americana).

A nível mundial existem dezenas de cultivares, encontrando-se definidas como, cultivares de amargo, cultivares de aroma e cultivares de *flavour*. A principal característica das cultivares de amargo é apresentarem um elevado teor de ácidos alfa, ao contrário das cultivares de aroma que apresentam sempre um teor dos mesmos mais baixo. As cultivares de *flavour* encontram-se entre as duas anteriores com bons teores de ácidos alfa e com um componente de aromas também importante.

A adição de lúpulo durante o processo de fabrico da cerveja pode ser feito sob a forma de inflorescências, pellets, e extratos. Todas elas apresentam pontos favoráveis e desfavoráveis, que serão objecto de uma descrição mais pormenorizada.

Zonas de Produção de Lúpulo A Nível Mundial

A nível mundial a produção de lúpulo está distribuída entre os paralelos 35° e 55° no hemisfério Norte e entre os paralelos 35° e 55° no hemisfério Sul. Na Figura 1 podem ser vistas as zonas de produção e algumas situações em que a produção é feita fora das zonas climáticas consideradas de melhor aptidão para a cultura.

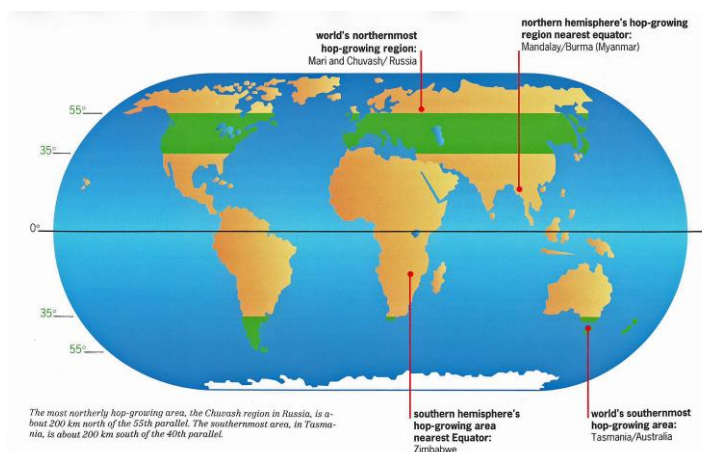


Figura 1. Zonas de produção de lúpulo a nível mundial. Fonte: Barth et al (1994).

Pela Figura 1. Podemos ver que o território de Portugal está todo incluído na zona de produção do hemisfério Norte. Para além das latitudes consideradas de melhor aptidão climática para a cultura encontram-se três zonas de produção fora destes paralelos, uma zona na Rússia uma em Burma (Myanmar) e uma outra no Zimbábue.

Principais Países Produtores, Áreas de Produção e Número de Cultivares

Destacam-se como produtores quer pela sua área em produção quer pela produção total a Alemanha e os Estados Unidos da América, sendo no entanto na Europa que se encontra mais de metade da área em produção mundial.

Na Tabela 1. São apresentados os valores das áreas em produção de alguns países bem como na Europa e no Mundo e ainda o número de cultivares existentes em cada um.

Dos dados da Tabela 1. podemos dizer que 68% da produção mundial está na Alemanha e Estados Unidos da América e que a Europa produz cerca de 58% desse total mundial. Segundo os dados estatísticos da FAO, a Etiópia aparece como o terceiro produtor mundial de lúpulo, no entanto não se encontram quaisquer dados sobre a produção, sobre as cultivares ou sobre a zona de produção, pelo que aqui deixamos em branco a produção.

Relativamente às cultivares podemos dizer que os EUA e a Alemanha possuem o maior número de cultivares em produção.

A Austrália cuja produção não incluímos, destaca-se de outros países, pelas 10 cultivares que tem em produção.

Tabela 1. Principais Países Produtores, Áreas de Produção e Número de Cultivares.
Fonte: Hopsteiner (2014).

País	Área (ha)	Número de Cultivares
Alemanha	17309	19
EUA	15536	29
R. Checa	4471	11
R. P. China	2701	2
Polónia	1404	11
Eslovénia	1216	6
Reino Unido	958	14
Etiópia		
Europa Total	28200	
Mundo Total	48069	

Principais Cultivares por País e Área em Produção

Das dezenas de cultivares existentes apresentamos na Tabela 2. Aquelas que têm maior área de produção relativamente ao ano dos dados estatísticos e nos três principais países produtores.

Dos dados apresentados destaca-se o facto de a Alemanha ter a cultivar Herkules (cultivar de amargo), como aquela com maior área de produção e os EUA terem a cultivar Cascade (cultivar de aroma), como aquela com maior área de produção.

Portugal tem apenas uma cultivar a Nugget (cultivar de *Flavour*), com uma área de 12 ha.

A Republica Checa apesar de ter muitas cultivares em produção, apresenta como grande cultivar em produção a cultivar Saaz (cultivar de aroma).

Relativamente à cultivar Nugget, destaca-se a área de produção de 145 ha na Alemanha e que tem vindo a decrescer por inadaptação da cultivar e os 671 ha nos EUA, país de origem da cultivar.

Tabela 2. Principais Cultivares por País e Área em Produção. Fonte: Hopsteiner (2014).

País	Cultivar	Área (ha)
Alemanha	Herkules	3345
	Perle	2875
	Tradition	2696
	Magnum	1934
	Tettnang	1215
	Nugget	145
EUA	Cascade	2692
	Centennial	1371
	Summit	1073
	Nugget	671
R. Checa	Saaz	3400
Portugal	Nugget	12

Tipos de Cultivares

Aplicamos o termo cultivares e não variedades porque o primeiro termo aplica-se a todas as plantas que foram de algum modo melhoradas ou tiveram intervenção do homem para a obtenção das suas características fisiológicas e químicas.

No lúpulo (*Humulus lupulus*), consideram-se através das suas características na composição química, três tipos de cultivares, nomeadamente amargo (bitter), aroma e mistas (*flavour*). Em seguida descrevemos estes tipos de cultivares.

Cultivares de Amargo (Bitter)

São caracterizadas por apresentarem níveis altos de ácidos alfa na sua composição química.

Na Tabela 3. São apresentados valores da composição química da cultivar Herkules como exemplo de uma cultivar de amargo.

A composição elevada em ácidos alfa (12%-17%), leva a que esta cultivar seja ainda considerada, uma cultivar de super alfa, uma outra classificação em função do teor de ácidos alfa e que apresenta mais dois níveis que são alfa e super high alfa.

Tabela 3. Composição química da cultivar de amargo Herkules. Fonte: Barth-Haas Group (Hop Varieties)

Composição	Peso %
Ácidos alfa	12.0-17.0
Ácidos beta	4.0-5.5
Óleos Essenciais	1.6-2.4 (mL/100g)
Polifenóis (taninos)	3.0-4.0
Farneseno % óleos totais	<1
Mirceno % óleos totais	30.0-50.0
Linalol % óleos totais	0.3-0.8
Xantohumol (polifenol)	0.6-0.7

Cultivares de Aroma

As cultivares de aroma distinguem-se das de amargo pelo seu mais baixo teor em ácidos alfa, o que faz com que a sua componente aromática tenha maior relevância.

A composição química diferente dessa componente aromática, confere a estas cultivares alguma particularidade e distinção aromática, o que as torna mais apetecíveis para os cervejeiros artesanais, pois é nestas cultivares que estes vão buscar a diferença nas suas cervejas.

Na Tabela 4. é apresentada a composição química da cultivar Hallertauer Tradition, como exemplo de uma cultivar de aroma .

Como pode ser visto na Tabela 4. esta cultivar apresenta um teor de ácidos alfa bastante baixo 4%-7%, sendo esta a característica principal que a distingue de uma cultivar de amargo.

Apesar de os óleos essenciais conforme a Tabela 4. apresentarem um teor inferior ao da cultivar de amargo Herkules, a cultivar apresenta um maior teor de linalol, o que neste caso aliado ao baixo teor de ácidos alfa a torna distinta.

Tabela 4. Composição química da cultivar Hallertauer Tradition. Fonte: Barth-Haas Group (Hop Varieties)

Composição	Peso %
Ácidos alfa	4.0-7.0
Ácidos beta	3.0-6.0
Óleos Essenciais	0.5-1.0 mL/100g
Polifenóis totais	4.0-5.0
Farneseno % óleos totais	<1
Mirceno % óleos totais	17.0-32.0
Linalol % óleos totais	0.7-1.2
Xantohumul (polifenol)	0.4

Cultivares de Aptidão Mista (*Flavour*)

As cultivares de aptidão mista, foram desenvolvidas com o objectivo de ter uma planta com um elevado teor de ácidos alfa e ao mesmo tempo ter uma componente aromática que lhe conferisse distinção relativamente a outras.

Na Tabela 5. são apresentados os valores da composição química da cultivar Nugget, considerada uma cultivar de aptidão mista.

Tabela 5. Composição química da cultivar Nugget. Fonte: Bart-Haas Group (Hop Varieties)

Composição	Peso %
Ácidos alfa	11.5-14.0
Ácidos beta	3.0-5.0
Óleos Essenciais	0.9-1.3 mL/100g
Polifenóis totais	3.0-4.0
Farneseno % óleos totais	<1
Mirceno % óleos totais	27.0-42.0
Linalol % óleos totais	0.5-1.0
Xantohumul (polifenol)	5.0-7.0

Como pode ser visto nos dados da Tabela 5. A cultivar apresenta um teor de ácidos alfa elevado 11.5%-14% e um teor de linalol equivalente ao da cultivar de aroma, aparecendo no entanto uma pequena diferença no teor de mirceno.

É de realçar nesta cultivar o alto teor de Xantohumol um polifenol com grande interesse para a indústria farmacêutica.

A Lupulina

Todos os compostos que fazem parte da composição química do lúpulo, são encontrados na lupulina, que é em termos mais simples são as pequenas partículas ou pó amarelo que se encontra dentro das inflorescências e protegido pelas brácteas e bractéolas.

Os teores dos compostos existentes na lupulina são como já vimos função da cultivar, mas o tipo de compostos que fazem parte desta é comum a todas as cultivares, pelo que faremos a seguir uma breve descrição dessa composição.

Composição da Lupulina

É composta por resinas moles (soft), resinas duras (hard), e óleos essenciais.

Resinas Moles

As resinas moles são os compostos que são precursores do gosto amargo da cerveja. São caracterizadas por serem solúveis em hexano.

Na sua composição química são compostas pelos ácidos alfa e pelos ácidos beta.

Os ácidos alfa conferem à cerveja o gosto amargo mais fino e dão estabilidade à sua espuma. No entanto não são exactamente os ácidos alfa que transmitem estas características mas sim as sua forma isomerizadas.

Os ácidos alfa são constituídos por humulonas com três forma, que diferem num radical, podendo assim ser n-humulonas, co-humulonas e ad-humulonas.

Na Figura 2. pode ser vista a estrutura química da humulona e a sua estrutura isomerizada bem como a estrutura do radical (R) que dá origem às diferentes humulonas.

Os ácidos beta são também precursores do gosto amargo da cerveja, mas com uma característica mais grosseira. São constituídos por lupulonas, aparecendo também as três formas n, co e ad por substituição do radical (R) na sua estrutura química.

Na Figura 2. Pode ser vista esta estrutura química da lupulona.

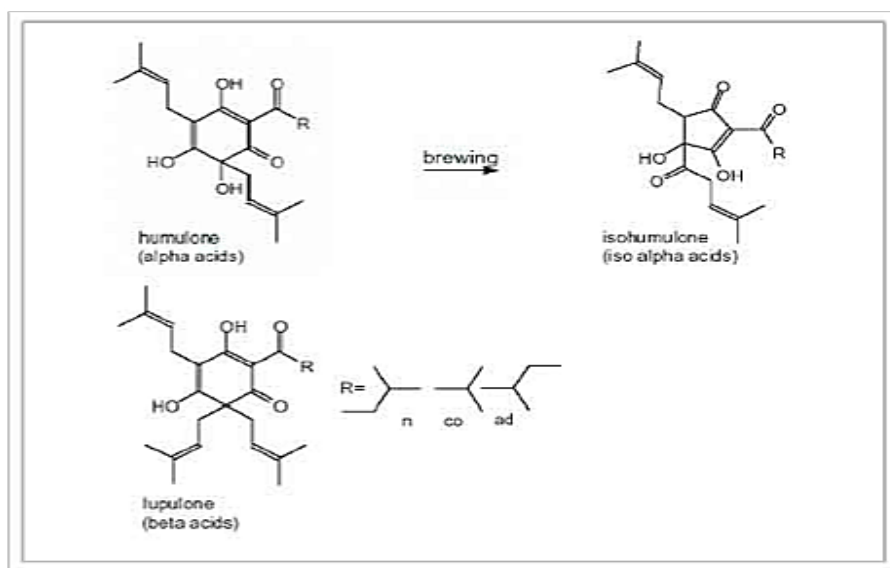


Figura 2. Estrutura química da humulona, lupulona, radicais e estrutura isomerizada da humulona.

Resinas Duras (Hard)

As resinas duras são de menor importância para a cerveja, pois são menos solúveis, durante o processo de fabricação da cerveja. No entanto conferem um gosto amargo agradável e contribuem para a estabilidade da espuma da cerveja.

São caracterizadas por serem insolúveis em hexano.

As resinas duras representam cerca de 20% do total das resinas.

Para a indústria farmacêutica, o xantohumol aparece como um composto químico importante e é aquele que existe em maior quantidade de entre as resinas duras, sendo também o precursor dos compostos isomerizados que dão o gosto amargo.

Óleos Essências

São o grupo de compostos químicos responsáveis pela componente aromática das várias cultivares e portanto aqueles que vão conferir à cerveja o seu perfil aromático.

Os grupos a que pertencem estes compostos são o grupo dos monoterpenos, os sesquiterpenos e os álcoois terpênicos.

Do grupo dos monoterpenos aparecem como compostos majoritários o mirceno, o limoneno e o alfa-pineno.

Do grupo dos sesquiterpenos aparecem como compostos majoritários o farneseno, o humuleno e o beta-cariofileno.

Do grupo dos álcoois terpênicos apenas aparece um composto que é o linalol.

Formas de utilização do lúpulo na cerveja

Na produção de cerveja o lúpulo é incorporado durante o processo de fabrico sob várias formas a que damos o nome de produtos do lúpulo.

Aparecem assim como produtos do lúpulo as inflorescências, pellets (granulado) e extratos.

Inflorescências

As inflorescências tem a característica de apresentarem um teor de humidade não superior a 12% e apresentam-se como produto prensado. A razão de serem secas e prensadas apenas está relacionada com questões de preservação do lúpulo. Se este não sofrer um processo de secagem que leve ao abaixamento do teor de humidade para 10%-12% o lúpulo degrada-se ao entrar espontaneamente em fermentação. Por outro lado o contacto com o ar leva a uma degradação por oxidação dos ácidos alfa, podendo esta chegar aos 10% mensais.

Pellets (Granulado)

É a forma mais comum de utilização do lúpulo na cerveja, sendo também um processo de preservação do lúpulo, pois ao prensar de forma mais intensa o contacto com o ar é menor pelo que as oxidações são de algum modo mais reduzidas. Uma vantagem do granulado relativamente ao lúpulo em inflorescências é o seu menor volume. Dois tipos de pellets aparecem no mercado e que apresentam características diferentes, pellets tipo 90 e pellets tipo 45.

O pellets tipo 90 apresenta como características conter todo o tipo de substâncias que existem no lúpulo natural, cerca de 90%, sendo removidas cerca de 10% de partes vegetativas.

O pellets tipo 45 apresenta como características maior concentração de lupulina em relação a outros grupos de substâncias durante o processamento sendo removidas 40% a 50% das partes vegetativas.

Extratos

Através de diferentes processos de extração da lupulina das inflorescências podem ser obtidos diferentes tipos de extratos. Aparecem como principais, por serem os mais requeridos pela indústria, o processo de extração por utilização como solvente o etanol,

tomando o nome de extrato etanólico, o processo de extração por CO₂ supercrítico tomando o extrato o mesmo nome e o processo de extração por CO₂ líquido tomando da mesma forma o extrato esse nome.

O extrato etanólico é obtido através da extração com uma mistura de etanol água. O extrato CO₂ supercrítico é obtido através da extração por submissão de CO₂ à pressão de 250 bar a 300 bar e temperatura de 40° a 45° C. O extrato CO₂ líquido é obtido através da extração por submissão de CO₂ à pressão de 50 bar e temperatura de 10° a 15° C.

Destes diferentes processos são obtidos produtos com composição química diferente, encontrando-se na Tabela 6. As principais diferenças entre os tipos de extratos.

Tabela 6. Características químicas dos vários extratos. Fonte: The Brewer International

Composição	Extrato Etanólico %	CO2 Supercrítico %	CO2 Líquido %
Resinas Totais	15.0-60.0	75.0-90.0	70.0-95.0
Ácidos Alfa	8.0-45.0	27.0-55.0	30.0-60.0
Ácidos Beta	8.0-20.0	23.0-33.0	15.0-45.0
Óleos Essenciais	0.0-5.0	1.0-5.0	2.0-10.0
Resinas Duras	2.0-10.0	5.0-11.0	Não
Polifenóis (Taninos)	0.5-5.0	0.1-5.0	Não

Da Tabela 6 podemos dizer que relativamente ao teor de resinas totais o extrato co2 líquido, apresenta o maior valor para este parâmetro o mesmo acontecendo para o teor de ácidos alfa, ácidos beta e óleos essenciais, o mesmo extrato não tem resinas duras nem polifenóis. O extrato etanólico tem a particularidade de a componente aromática poder ser 0%, implicando portanto a possibilidade de não existência de componente aromática ou esta ser muito redzuda, verifica-se no entanto para os outros processos, uma diminuição do teor de óleos essenciais, apresentado no entanto o popcesso por CO₂ líquido um maior teor.

Pode concluir-se da Tabela 6. Que os extratos apresentam a desvantagem, relativamente às inflorescências e aos pellets, de a sua componente aromática ser sempre muito baixa.

Bibliografia

Barth, H. et all (1994) – The Hop Atlas.

Barth-Haas Group (hop varieties). www.barthhaasgroup.com.

Métodos da Analytica EBC (European Brewery Convention) secção 7 - Hops and Hop Products.

Métodos da ASBC (American Society of Brewing Chemists) secção Hops Methods.

Hopsteiner (2014) - 2014 Guidelines for hop buying.

www.barthhaasgroup.com

The Brewer International (2003). Hops and Hop Products. 3(1): 21-25

Verzele, M. Keukeleire, D. (1991). Chemistry and Analysis of Hop Beer Bitter Acids. Developments in Food Science 27.

Produção e tecnologia de cereais: notas breves sobre o cultivo de cevada em Portugal

M Ângelo Rodrigues¹, Vítor Manuel Ramalheira Martins¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

A cevada é o principal cereal usado no fabrico de cerveja. Portugal é um produtor modesto de cevada, pelo que a indústria cervejeira nacional funciona com base em cevada importada. Em Portugal a cevada cultiva-se quase exclusivamente em sequeiro, sendo as produções unitárias de grão muito baixas quando comparadas com as produtividades obtidas em países situados a latitudes mais elevadas. Neste trabalho procuram explicar-se as causas das baixas produtividades obtidas em Portugal. Sobretudo interessa saber se as baixas produtividades são devidas a causas naturais ou se podem ser alteradas com a introdução de melhorias nas técnicas de cultivo. O trabalho está organizado em quatro tópicos principais: origem e situação atual da cultura; aspetos botânicos e morfologia da planta; adaptação ecológica da cevada; e técnica cultural. Discutem-se ainda brevemente alguns critérios a observar na escolha das cultivares e como esta espécie está integrada nas rotações.

Palavras-chave: *Hordeum vulgare*; adaptação ecológica; técnica cultural; fertilização azotada

Origem e situação atual da cultura

A cevada é cultivada desde o neolítico. O ancestral mais provável de todas as cevadas cultivadas será *Hordeum spontaneum* L., uma cevada espontânea de ráquis frágil que perde as sementes imediatamente após a sua maturação fisiológica. A cevada cultivada foi selecionada a partir de plantas de ráquis tenaz que não perdiam as sementes e permitiam a colheita do grão. Registos arqueológicos no Vale do Nilo (Egito) demonstram que o processo de domesticação terá ocorrido há mais de 15000 anos, tendo a cevada acompanhado o processo de domesticação de cereais importantes como o trigo. Contudo, o sudoeste da Ásia é considerado o principal centro de distribuição e diversidade do género, podendo ser a origem das cevadas cultivadas. Assim, a cevada poderá não ter um centro de origem único mas vários. Informação mais detalhada sobre a

origem do cultivo da cevada pode ser consultada em Cano (1989a) e López-Bellido (1991).

No presente, a cevada é considerada o quarto cereal mais importante à escala mundial. Em 2013 produziram-se 143 959 778 t (Figura 1), tendo este valor vindo a manter-se estável nas últimas décadas em valores ligeiramente abaixo das 150 000 000 t (Figura 2). A produção de cevada está distribuída por todos os continentes, embora a produção na europa em 2013 tenha representado 59,6% da produção total mundial (Figura 3). Os maiores produtores mundiais são Federação Russa, Alemanha, França, Canadá e Espanha (Figura 4).

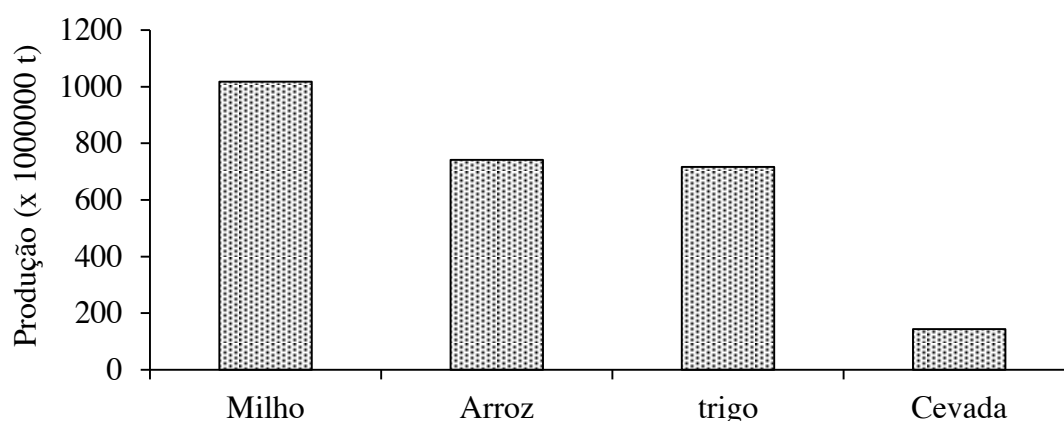


Figura 1. Produção total mundial dos quatro cereais mais importantes da atualidade (FAO, 2015).

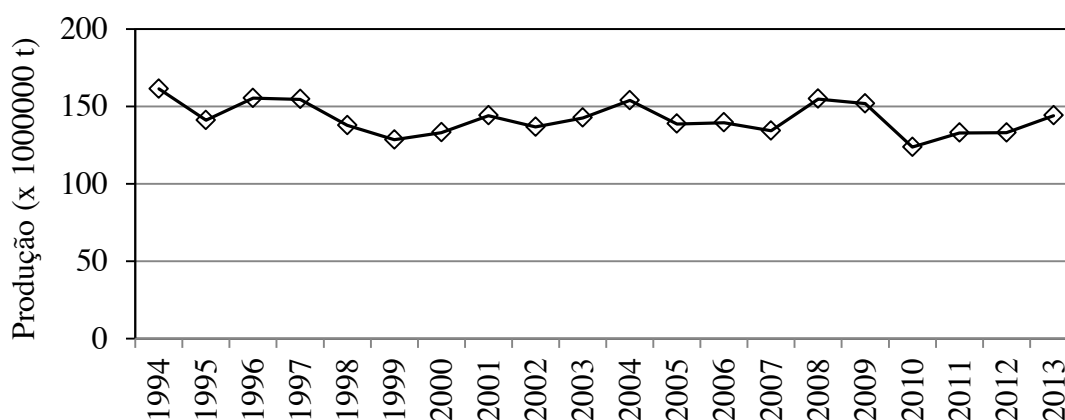


Figura 2. Evolução da produção mundial de cevada ao longo das últimas duas décadas (FAO, 2015).

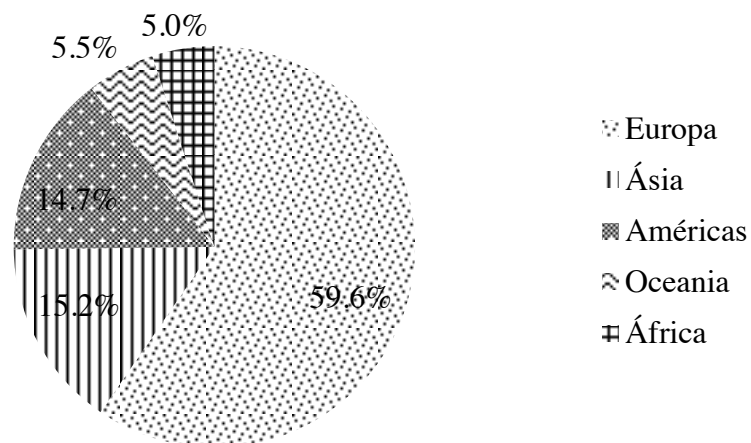


Figura 3. Importância relativa da produção de cevada nos diferentes continentes (FAO, 2015).

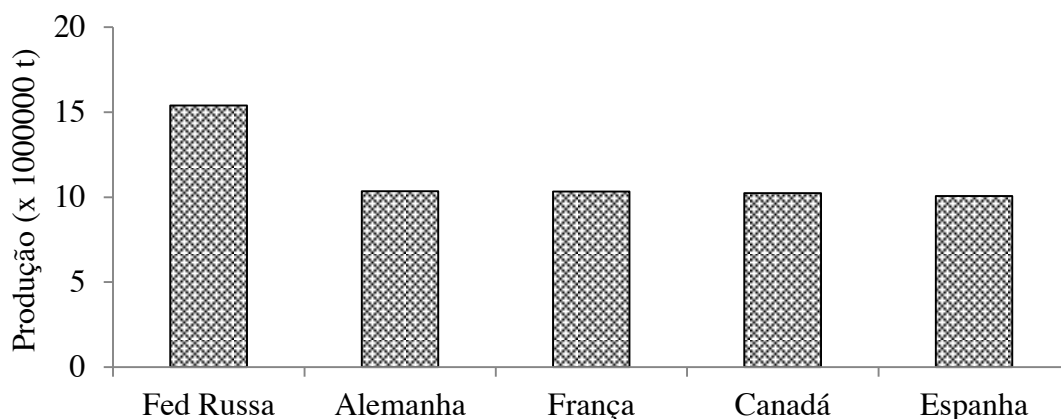


Figura 4. Produção de cevada em 2013 nos cinco países maiores produtores mundiais (FAO, 2015).

Em Portugal, a produção de cevada tem vindo a perder significado. As áreas semeadas encontram-se abaixo dos 17 000 ha e têm registado uma evolução tendencialmente decrescente ao longo dos anos (Figura 5). O maior registo histórico de área semeada (143 482 ha) remonta ao ano de 1976 (FAO, 2015). A produção de grão nacional reflete a evolução na área semeada, com um decréscimo ao longo das últimas décadas.

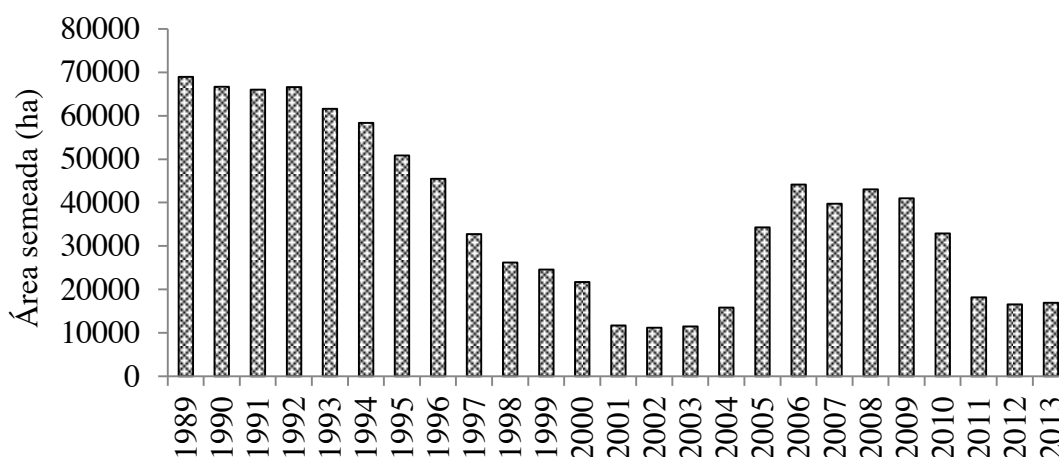


Figura 5. Evolução da área semeada de cevada em Portugal de 1989 a 2013 (FAO, 2015).

Aspetos botânicos e morfologia da planta

As cevadas cultivadas pertencem à espécie *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. O ancestral comum a todas as cevadas cultivadas terá sido *Hordeum spontaneum* (cevada de ráquis frágil), como se referiu. A domesticação terá consistido na seleção das plantas de ráquis tenaz que não perdiam as sementes.

A cevada apresenta um sistema radicular relativamente superficial (não ultrapassa 120 cm), em comparação com outros cereais de inverno como o trigo e o centeio de sistema radicular mais profundo. Na cevada, mais de 60% das raízes encontram-se normalmente nos 25 cm superficiais. O caule é um colmo, fistuloso, bastante baixo em comparação com as variedades tradicionais dos restantes cereais (as variedades modernas de trigo também apresentam caules bastante baixos). Contudo, apesar de apresentar caule baixo e fistuloso, a cevada é bastante sensível à acama fisiológica. As folhas apresentam aurículas amplexicaules, muito desenvolvidas e esbranquiçadas. A lígula é também muito desenvolvida e afiada. A inflorescência é uma espiga dística. Apresenta três espiguetas unifloras em cada curvatura ou nó da ráquis, ao contrário de trigo, centeio e tritcale que apresentam apenas uma espiguetas multiflora por nó. As glumas são rudimentares (dois pelos). As glumelas protegem cada uma das flores, sendo a exterior normalmente aristada. Ao contrário de trigo, centeio e tritcale as glumelas ficam aderentes ao grão na maturação. A fecundação é predominantemente autogâmica, ocorrendo sobretudo cleistogamia (quando as anteras saem e libertam o pólen no exterior já a maior parte das flores ficaram fecundadas pelo pólen das suas próprias anteras). O grão é um fruto seco e indeiscente (cariopse) com as glumelas aderentes. Descrições mais detalhadas sobre

aspectos genéticos e morfológicos da cevada podem ser vistas em Cano (1989b), López-Bellido (1991) e Guerrero (1999).

A particular organização da espiga da cevada, com três espiguetas por nó, permite classificar as cevadas de acordo com a fertilidade das flores. Quando todas as flores são férteis, originam-se seis carreiras de grão (três em cada nó da espiguetas), sendo estas cevadas designadas de hexásticas ou de seis carreiras. Em algumas cevadas, as duas flores laterais apresentam-se rudimentares e não são férteis. Estas cevadas, que serão provavelmente as mais antigas, são designadas de cevadas dísticas ou de duas carreiras. Ainda que com menor importância, podem ocorrer cevadas em que é a flor central que não é fértil, originando cevadas tetrásticas ou de quatro carreiras.

Frequentemente as cevadas dísticas são associadas ao uso na indústria cervejeira e de outras bebidas alcoólicas. Contudo, presentemente também há cevadas hexásticas usadas na indústria das bebidas alcoólicas. Pelo contrário, as cevadas hexásticas são maioritariamente usadas em rações para animais por normalmente não atingirem o nível de qualidade adequado para maltagem (Brufau, 1989). As cevadas hexásticas são também frequentemente usadas como ferrejo para dar em verde aos animais. Em Portugal, no Sul do país cultivam-se maioritariamente cevadas dísticas para a indústria cervejeira. No norte do país tem apenas tradição o cultivo de cevadas hexásticas para ferrejo. As cevadas hexásticas de uma maneira geral contêm maiores teores em fibras (menor enchimento dos grãos da filas exteriores ficando proporcionalmente com mais fibra) e mais pobres em amido, o que limita a sua utilização na indústria cervejeira. Na alimentação animal o grão de cevada é valorizado pelo elevado conteúdo em lisina e treonina (dois aminoácidos essenciais), mas a presença de β -glucanas limita o seu uso em aves, sobretudo em frangos de engorda. O grão de cevada contém muita fibra e pouca gordura pelo que se revela adequado para engorda de porcos. De uma maneira geral, as boas cevadas para malte são também as melhores para ração (Brufau, 1989). Contudo, é frequente derivar para ração os lotes de cevada que não atingem qualidade suficiente para maltagem.

Adaptação ecológica da cevada (referência para Portugal)

Os cereais de inverno, como a cevada, instalam-se relativamente bem em Portugal. As sementes germinam bem mesmo a temperaturas relativamente baixas, sendo o principal risco de uma má emergência situações em que possam ocorrer precipitações excessivas e continuadas após a sementeira que dificultem a difusão do oxigénio no solo.

A cevada necessita de vernalização, isto é, as plantas têm de ficar submetidas a uma determinada quantidade de frio para uma boa indução de floração. Contudo, as necessidades diferem entre variedades. Variedades com elevadas necessidades em frio (ou de ciclo longo) devem semear-se no outono. No Sul do país, em que é habitual fazerem-se sementeiras de cevada tardias (fevereiro ou eventualmente março), devem usar-se variedades alternativas (também chamadas de Primavera ou de ciclo curto) de menores necessidades em frio.

A germinação e as primeiras fases de desenvolvimento da cevada (até ao início do encanamento) ocorrem com normalidade. Contudo, as condições de crescimento degradam-se grandemente a partir das fases próximas do fim do encanamento e durante todas as fases subsequentes, emborrachamento, floração e enchimento do grão. Tomando por referência para exercício teórico um ano de clima igual à normal climatológica (Figura 6, normal climatológica para Beja), verifica-se que a partir do fim de abril e, sobretudo, durante o mês de maio e posteriores, a precipitação não assegura disponibilidade de água em quantidades adequadas para as plantas. As temperaturas são muito elevadas, o que origina elevada evaporação de água e transpiração das plantas, reduzindo a eficiência de uso da água disponível no solo. As temperaturas altas são também negativas para a performance fisiológica das plantas. As temperaturas ótimas para o período vegetativo deverão ser próximas de 15 °C e após o espigamento de 17 a 18 °C (López-Bellido, 1991). À medida que avança a Primavera reduz-se significativamente a humidade atmosférica, aumentando proporcionalmente a demanda evaporativa das plantas. A radiação, por seu lado, tende a ser também muito elevada. Resumidamente, baixa disponibilidade de água no solo, humidade atmosférica baixa e temperatura elevada originam forte transpiração das plantas e a necessidade de fecho dos estomas, o que limita severamente o processo fotossintético. Deve recordar-se que a cevada é uma planta de mecanismo C₃ (processo fotossintético em que o dióxido de carbono e a ribulose-bifosfato, RuBP, são convertidos em 3-fosfoglicerato), significando que em condições de temperatura elevada e radiação excessiva ocorre fotorrespiração [à medida que a temperatura aumenta a RuBisCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase) incorpora muito oxigénio em RuBP em vez de carbono], o que reduz a eficiência do processo fotossintético. Plantas de metabolismo C₃ são pouco eficientes em ambiente de elevada radiação, temperatura alta e baixa disponibilidade hídrica. O fecho dos estomas restringe a disponibilidade de CO₂, reduzindo a razão CO₂/O₂, o que incrementa a fotorrespiração.

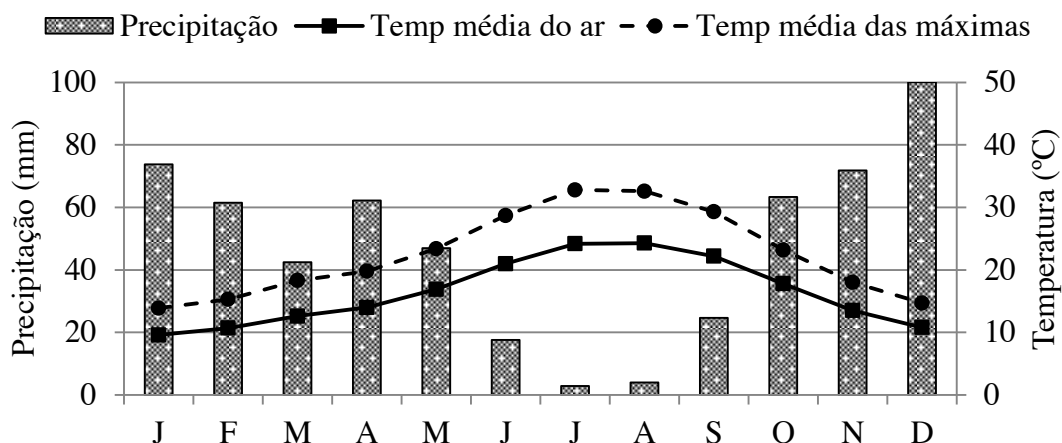


Figura 6. Precipitação mensal, temperatura média do ar e temperatura média das máximas em Beja para o período 1970/2000 (IPMA, 2015).

Os efeitos práticos sobre as plantas das condições referidas podem ser resumidos da seguinte forma. As condições desfavoráveis fazem-se sentir normalmente ainda antes da floração. A percentagem de caules que vão produzir espiga é menor em comparação com plantas que crescem em regiões ecológicas mais favoráveis. Na prática, a planta não atinge um índice de área foliar (razão entre superfície foliar e correspondente unidade de área de solo) que lhe permita maximizar a radiação intercetada. O mais importante, contudo, é o efeito das condições referidas na duração da área foliar (integral do índice de área foliar no tempo; tem em conta a extensão do aparato fotossintético e a duração do processo fotossintético). A 25 °C a senescência de uma folha ocorre em 4 semanas, enquanto a 10 °C a senescência só ocorre após 11 semanas (López-Bellido, 1991). Assim, as plantas têm dificuldade em atingir índices de área foliar elevados e, sobretudo, apresentam reduzida duração da área foliar. Acresce que a extrema limitação hídrica obriga à remobilização de elevada quantidade de fotoassimilados para o sistema radicular na procura de água, o recurso mais limitante. De uma maneira geral, em ambiente mediterrânico, como acontece em Portugal, o fim de ciclo surge de forma abrupta não permitindo elevadas produtividades. Na sequência do afilhamento as plantas apresentam poucas espigas ao nível da espiga principal, as espigas surgem fracamente desenvolvidas, com reduzido número de grãos por espiga, e, em anos de stresse severo, o próprio enchimento do grão pode ficar comprometido sendo penalizada a qualidade do grão. Para uma descrição mais detalhada de como as condições mediterrânicas afetam a performance da cevada pode consultar-se Garcia del Moral e Ramos (1989) e López-Bellido (1991).

Os melhores solos para cultivar cevada em ambiente mediterrânico e em sequeiro deveriam ser os que apresentam maior capacidade de armazenamento de água, na medida em que conferem alguma proteção contra a falta de chuva na Primavera. Texturas franco-argilosas e elevada espessura efetiva deveriam ser, por isso, as características do solo mais favoráveis. Contudo, a cevada necessita de solos bem drenados. Em Portugal os solos com texturas mais argilosas são utilizados preferencialmente para produzir trigo. A cevada é também uma planta pouco tolerante a solos ácidos, estando melhor adaptada a solos de pH elevado. É ainda uma planta relativamente tolerante à salinidade.

A cevada tem um ciclo mais curto que o trigo, sendo por isso mais resistente à seca (o período espigamento/maturação é mais curto). Este aspeto, associado ao facto de ser uma planta tolerante à alcalinidade e salinidade, faz com que a cevada seja um cereal cujo cultivo se aproxime bastante das zonas desérticas. Em concordância, verifica-se que em Portugal nas primaveras mais secas, a cevada tende a ter maiores produtividades que o trigo. O seu ciclo particularmente curto faz com que a cevada se estenda também para latitudes mais altas que o trigo, podendo ser cultivada no curto Verão dos países do Norte da Europa.

As condições ambientais referidas originam as fracas estatísticas de produção de cevada em Portugal. A figura 7 mostra a produtividade da cevada em Portugal e em alguns dos países em que a cevada atinge melhor performance. Na Bélgica, a produtividade média do país atingiu 8,2 t/ha em 2013, enquanto em Portugal a produtividade ficou em 1,3 t/ha, mais de seis vezes inferior. As razões destes números não são de natureza tecnológica, isto é, as produtividades em Portugal não são baixas pelo facto dos nossos produtores fazerem alguma coisa errada. As produtividades são baixas porque o clima não permite obter outros resultados. Os Estados Unidos foram incluídos na figura exatamente para desmistificar esta questão. Também neste país as produtividades ficam aquém das obtidas na Bélgica, ainda que sejam superiores às obtidas em Portugal. Estados Unidos são, contudo, um país ao qual se associa sempre a melhor tecnologia de cultivo.

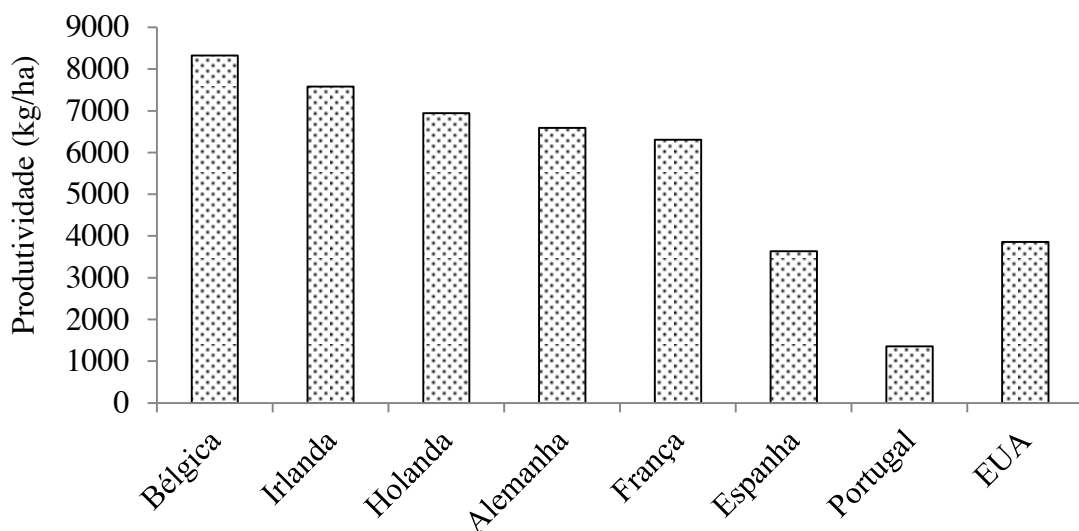


Figura 7. Produtividade média da cevada em 2013 em alguns países incluindo Portugal (FAO, 2015).

A figura 8 mostra as produtividades médias nacionais ao longo dos últimos anos. Observem-se as grandes flutuações anuais em torno da média, isto é, surgem anos de melhores e piores produções sem padrão aparente. Isto mostra o efeito da irregularidade do clima mediterrânico na produtividade da cevada e também o facto das condições ambientais que determinam a produtividade não serem controladas pelo homem. É também de realçar que as produtividades não têm aumentado de forma consistente ao longo dos anos, o que também mostra que as produções não estão dependentes da evolução das condições tecnológicas de cultivo (variedades mais produtivas, melhores fertilizações, etc...) mas sempre das variáveis ambientais.

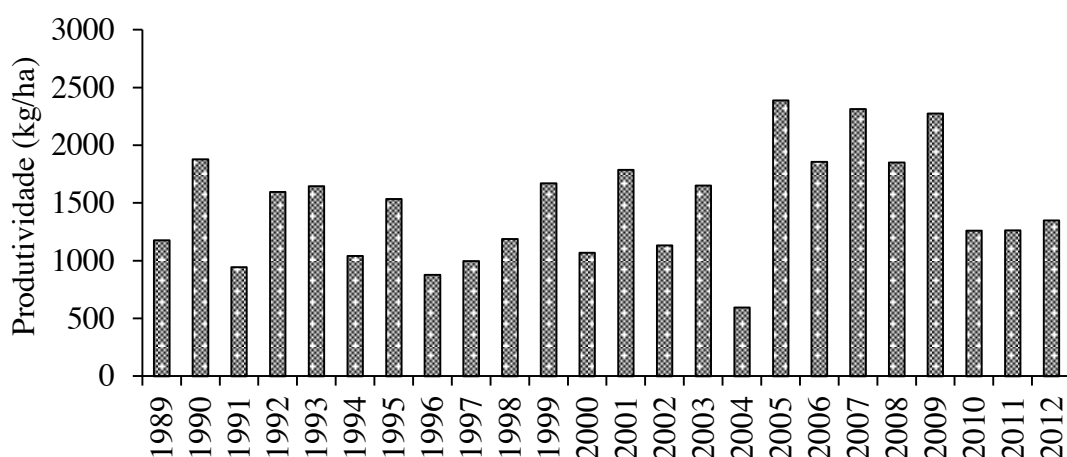


Figura 8. Evolução da produtividade da cevada em Portugal de 1989 a 2013 (FAO, 2015).

Técnica cultural

A cevada tem uma técnica cultural muito semelhante à dos restantes cereais de outono/inverno. Neste documento são destacadas algumas das principais diferenças da técnica cultural da cevada em comparação com o trigo, que será a cultura de referência em Portugal de entre os cereais de outono/inverno.

A cevada, quando cultivada como forragem para alimentação animal, uso habitual no Norte do país, é semeada no outono, desde outubro até ao início de novembro. A cevada cultivada para grão, tal como acontece no sul do país, pode ser semeada até bastante mais tarde em comparação com os outros cereais de inverno. É normal semear-se cevada no mês de fevereiro e eventualmente no início de março. Quando se fazem estas sementeiras tardias devem usar-se variedades alternativas, com menores necessidades de vernalização. No cultivo de cevada para grão procura atingir-se 250 a 400 espigas/m², usando 100 a 180 kg de semente por hectare dependendo da fertilidade do solo (Cano, 1989c; López-Bellido, 1991; Guerrero, 1999).

A fertilização azotada é provavelmente o aspeto da técnica cultural em que a cevada, quando cultivada para malte, mais difere dos restantes cereais de inverno. Como se pretende promover o conteúdo em amido, usa-se menos azoto em comparação com o trigo. A aplicação de azoto em doses elevadas aumenta o teor de proteína no grão. Algumas proteínas são desejáveis (α - e β -amilase, β -glucanase e proteases diversas), uma vez que desempenham uma importante ação catalítica ao nível de alguns componentes químicos do grão, mas as proteínas de reserva, como as hordeínas e glutelinas, que são sobretudo as que se acumulam quando se aplica azoto em excesso, não são desejáveis por originarem menor conteúdo em amido no grão e menor rendimento em extrato (Cano, 1989c; López-Bellido, 1991). As adubações de cobertura podem ter um efeito particularmente negativo, pois quanto mais azoto estiver disponível na fase final do ciclo maior será o teor de proteína no grão. Por outro lado, a sementeira da cevada faz-se mais tarde que a do trigo, o que reduz o risco de perdas de azoto por desnitrificação e lixiviação de nitratos durante o inverno. Assim, na cevada, em comparação com os outros cereais, a adubação de fundo ganha importância enquanto a adubação de cobertura a perde. Pelas razões referidas, em cobertura devem evitar-se adubos amoniacais já que se considera que têm um efeito mais prolongado no tempo, ficando azoto disponível no solo até fases mais avançadas do ciclo (Santos, 2015). A cevada é uma planta bastante sensível à acama fisiológica, sendo outra razão que aconselha a moderação da dose de azoto.

Relativamente aos outros nutrientes, a fertilização da cevada não apresenta diferenças apreciáveis para os restantes cereais. Refira-se contudo a importância atribuída ao enxofre. Enxofre aplicado por via foliar ao afilhamento parece ter um efeito muito favorável no aumento do número de espigas com desenvolvimento ao nível da espiga principal (López-Bellido, 1991), sendo este um aspeto muito importante do cultivo da cevada na região mediterrânica.

A cevada, tal como qualquer outra cultura, pode sofrer prejuízos devido à competição de infestantes e incidência de doenças e pragas. A sementeira tardia pode reduzir a incidência de infestantes. Contudo, em ambiente mediterrânico, em que a limitação hídrica é o principal fator limitante, a presença de infestantes na seara limita-lhe severamente a produtividade. No combate a infestantes deve fazer-se rotação de culturas e aplicar todas as medidas culturais que limitem a infestação, mas a aplicação de herbicidas é obrigatória na produção de cevada para grão. A lista de substâncias ativas autorizadas é extensa (AGRO-MANUAL, 2015), devendo optar-se pela solução herbicida mais adequada ao tipo de infestação em causa. Algumas das doenças mais importantes da cevada são ferrugens (amarela e castanha), helmintosporiose, oídio, rincosporiose e septoriose. Contudo, a necessidade de fazer tratamentos depende da forma como decorre o ano. A lista de substâncias fungicidas autorizadas em cevada é também extensa (AGRO-MANUAL, 2015). A cevada apresenta baixo risco de dano provocado por pragas em comparação com muitas outras culturas. Podem eventualmente surgir problemas com afídios, alfinete, lagarta-sete-coiros e larva-lesma. Ainda que não seja habitual, se algum destes problemas assumir proporções que necessite de tratamento, há também substâncias autorizadas que podem se aplicadas (AGRO-MANUAL, 2015).

Crítérios na escolha das cultivares

As cultivares devem apresentar características adequadas ao fim. Em Portugal cultiva-se cevada sobretudo para malte. São preferíveis variedades de grão grande, arredondado e tegumento fino que origem elevado rendimento em extrato (Cano, 1989c; López-Bellido, 1991). Outro aspeto importante é a estabilidade das produções. Em condições tão marginais de cultivo, pode não ser aconselhável escolher cultivares com elevado potencial genético manifestado em regiões do globo com boas condições ecológicas. Melhor estratégia pode ser a utilização de variedades com boa capacidade de produzir em condições adversas, em particular em condições de stresse hídrico severo. A

capacidade fotossintética da espiga parece ser relevante. As variedades de cevada para cultivar em ambiente mediterrânico devem possuir aristas longas (Garcia del moral, 1989; López-Bellido, 1991). As variedades devem, tanto quanto possível, ser resistentes à acama fisiológica e também a doenças e pragas.

Inserção na rotação

A cevada é tradicionalmente uma cultura de sequeiro. Apesar da área de regadio ter vindo a aumentar em Portugal, sobretudo associada ao Alqueva, não é exetável que as rotações de regadio incluam regularmente cevada. Assim, a cevada deverá ser integrada sobretudo em rotações de sequeiro. O ideal seria conceber uma rotação a quatro anos. Essa rotação poderia incluir girassol, uma leguminosa, colza e eventualmente um segundo cereal como o trigo. Infelizmente, em Portugal, no presente a área de leguminosas para grão é insignificante. Tem havido uma ténue esperança em torno do grão-de-bico de inverno mas ao que parece a cultura não tem sido opção. O girassol também tem enfrentado dificuldades devido às reduzidas produtividades que atinge. A colza, sendo uma cultura de inverno, teria em teoria melhor potencial de produção que o girassol. Contudo, Portugal não tem tradição no cultivo de colza. Talvez a excelente valorização atual da semente de colza a torne mais apetecível para os produtores nacionais de cereais podendo esta cultura dar o seu contributo no enriquecimento das rotações de sequeiro.

Referências

- AGRO-MANUAL 2015. Produtos fitofarmacêuticos, organismos auxiliares, jardins & espaços verdes, fertilizantes, sementes. AGRO-MANUAL publicações, Lda., Odivelas.
- Brufau, J. 1989. La cebada como materia prima para piensos. In: Cano, J.L.M. (Ed.) - *La cebada: morfología, fisiología, genética, agronomía e usos industriales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 217-233.
- Cano, J.L.M. 1989a. Taxonomía, citología, origen filogenética. In: Cano, J.L.M. (Ed.) - *La cebada: morfología, fisiología, genética, agronomía e usos industriales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 19-23.
- Cano, J.L.M. 1989b. Morfología y desarrollo de la planta. Taxonomía varietal. In: Cano, J.L.M. (Ed.) - *La cebada: morfología, fisiología, genética, agronomía e usos industriales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 25-64.
- Cano, J.L.M. 1989c. Agronomía. Patología. In: Cano, J.L.M. (Ed.) - *La cebada: morfología, fisiología, genética, agronomía e usos industriales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 179-198.

- FAO 2015. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália. Disponível em: <http://faostat3.fao.org> (consulta em julho de 2015).
- García del Moral, L.F., Ramos, J.M. 1989. Fisiología de la Producción de grano. In: Cano, J.L.M. (Ed.) - *La cebada: morfología, fisiología, genética, agronomía e usos industriales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, p. 137-178.
- Guerrero, A. 1999. *Cultivos herbáceos extensivos*. 6th ed. Ed. Mundi-prensa, Madrid.
- IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera) 2015. Normais climatológicas 1970-2000 (Beja). Disponível em <<https://www.ipma.pt/pt/otempo/prev.localidade/index.jsp?localID=2&cidadeID=2>> (consulta em julho de 2015).
- López-Bellido, L. 1991. *Cultivos herbáceos: cereales*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Santos, J.Q. 2015. Fertilização. Fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos. Publíndústria, Edições Técnicas, Porto.

Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada

Vítor Manuel Ramalheira Martins¹, M Ângelo Rodrigues¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

O processo de maltagem da cevada consiste na germinação e secagem controlada do cereal, tendo como principal objetivo a obtenção de um produto com atividade enzimática, coloração e estabilidade adequadas. É possível obter maltes com características bastante distintas, no que se refere à sua cor e atividade enzimática, o que também possibilita a obtenção de cervejas com diferentes características. Com este trabalho pretende-se descrever o processo de maltagem da cevada, abordando numa fase inicial a estrutura e composição química do grão de cevada. Serão também descritas as principais modificações químicas que ocorrem ao nível dos principais componentes químicos do grão de cevada.

Palavras-chave: cevada; maltagem; amido; β -glucanas; proteínas; atividade enzimática

Estrutura e composição química do grão de cevada: uma visão geral

A cevada é o principal cereal utilizado a nível mundial para o processo de maltagem, podendo-se utilizar as cevadas dísticas ou as cevadas hexásticas para a produção de malte (Gupta *et al.*, 2010). Na Europa, as cevadas dísticas são bastante utilizadas na indústria cervejeira, dado produzirem malte com maior conteúdo de amido e menor quantidade de proteína (Palmer, 2006). Este facto permite obter mais extracto a partir do malte, para além de evitar alguns problemas de turbidez na produção da cerveja. No entanto, nos Estados Unidos existe tradição na utilização de cevadas hexásticas para a produção de malte. Apesar da sua menor riqueza em amido, o malte obtido é caracterizado pelos seus elevados níveis de enzimas, tornando-o adequado para a produção de cervejas que incluem adjuntos no seu fabrico, como sucede no caso de algumas cervejas norte-americanas.

O grão de cevada é formado por uma cariopse revestida por uma casca (Figura 1) que desempenha uma importante função protetora desde a colheita (Olkku *et al.*, 1995) até ao processo de maltagem (Meredith *et al.*, 1962).

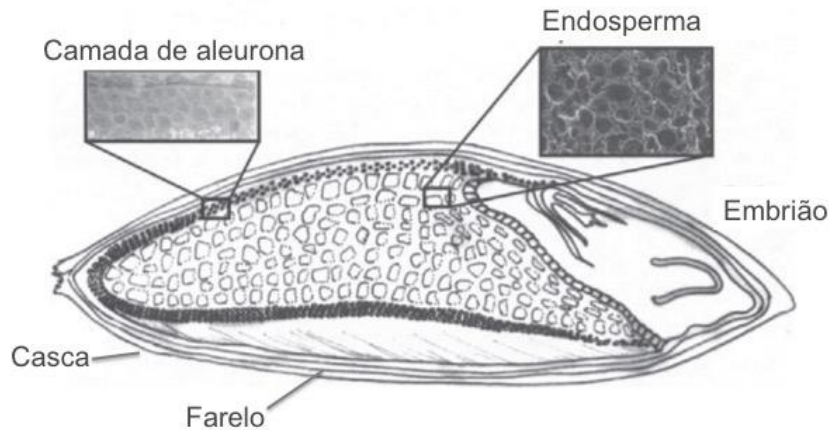


Figura 1. Estrutura geral de um grão de cevada (Adaptado de Fox, 2010).

Tipicamente, a casca representa cerca de 10-12% do peso seco total do grão de cevada (Palmer, 2006), no entanto este valor pode chegar até aos 25%, dependendo de factores como a variedade de cevada cultivada e as condições climáticas durante o crescimento da planta (Evers *et al.*, 1999). A casca é composta por β -glucanas, celulose, lenhina e pentosanas que se encontram presentes como componentes das paredes celulares (Lewis & Young, 1995). É também possível encontrar na sua composição compostos fenólicos e substâncias minerais (Briggs, 1978).

A cariopse é constituída por farelo, camada de aleurona, endosperma e embrião (Figura 2). O farelo pode representar 2-3% do peso seco total do grão (Palmer, 2006) e é formado por camadas de células com características distintas, tais como o pericarpo e testa, que desempenham uma função protetora. O pericarpo é uma estrutura semipermeável composta por várias camadas de células comprimidas que, à exceção da ausência de lenhina, tem uma composição química bastante semelhante à da casca (Munck, 1981). A testa é composta por celulose, compostos fenólicos e pigmentos de origem lipídica (Hockett, 2000; Palmer, 2006).

A camada de aleurona representa 4-5% do peso seco total do grão e é composta por células com paredes celulares espessas (cerca de 3 μ m), formadas principalmente por pentosanas (60%) e β -glucanas (30 %) (Palmer, 2006). Do ponto de vista botânico, a camada de aleurona é o revestimento do endosperma (Hoseney, 1991). É uma região do grão de cevada rica em ácido fítico, lípidos e proteínas (Palmer, 2006).

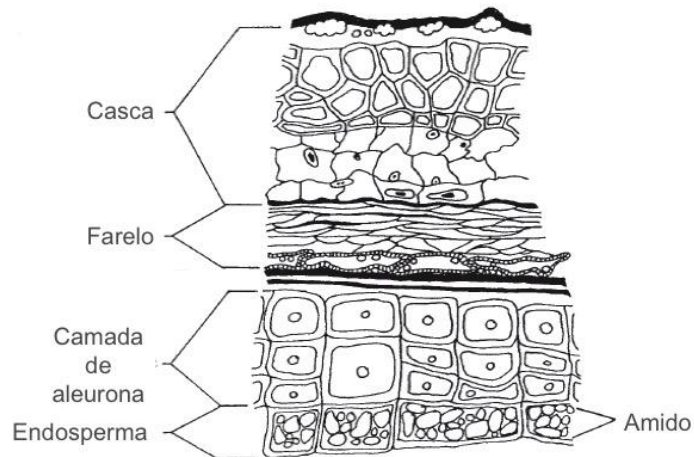


Figura 2. Estrutura detalhada de um grão de cevada (Adaptado de Jadhav *et al.*, 1998).

O embrião representa cerca de 2-3% do peso seco total do grão de cevada (Palmer, 2006), sendo constituído por cerca de 7% de celulose, 14-17% de lípidos, 5-10% de matéria inorgânica, 34% de proteína, 5-10% de rafinose e 14-15% de sacarose (Briggs, 1978). Apesar de apenas contribuir para cerca de 2-3% do peso seco total do grão, o embrião desempenha um papel crucial no processo de maltagem. Durante a maltagem, o embrião produz ácido giberélico que irá induzir as células da camada de aleurona a produzir enzimas, tais como α -amilases, dextrinases limite, *endo*-glucanases, *endo*-proteases e xilanases (Palmer, 1989), que irão degradar alguns componentes do endosperma. Apesar da camada de aleurona ser o principal tecido produtor de enzimas, tem sido proposto que, em determinadas condições, o embrião poderá produzir até cerca de 10% das enzimas do endosperma (Palmer, 2006), particularmente α -amilases.

O endosperma representa a maior porção do grão, constituindo cerca de 77-82% do peso seco total do grão de cevada (Palmer, 2006), e é composto principalmente por amido e por proteínas. Durante o processo de maltagem, alguns dos componentes do endosperma vão ser sujeitos à ação de diversas enzimas sintetizadas na camada de aleurona e embrião, nomeadamente amilases, β -glucanases e proteases. Deste modo, para uma melhor compreensão destes processos, que serão descritos mais adiante, iremos abordar a composição química do endosperma de uma forma mais detalhada.

Composição química do endosperma: uma visão detalhada

O endosperma funciona como uma fonte de nutrientes para o embrião durante a etapa de germinação que faz parte do processo de maltagem. As paredes celulares do

endosperma têm cerca de 2 μm de espessura e são compostas por β -glucanas (70%), pentosanas (20%) e proteínas (5%) (Palmer, 2006). No interior destas células encontramos principalmente grânulos de amido envoltos por uma matriz proteica (Hoseney, 1991).

O amido é o componente mais abundante do endosperma e do grão de cevada, representando cerca de 60% da massa total do grão (Fox, 2010). O amido é formado por amilose e amilopectina, que são polímeros de D-glucose, presentes em proporções distintas, dependendo da origem botânica do cereal. Na cevada, a proporção de amilose e amilopectina é cerca de 1:3 (Palmer, 1983). Na molécula de amilose os resíduos de D-glucose estão ligados principalmente por ligações glicosídicas α -(1,4), o que lhe confere uma forma essencialmente linear, enquanto na amilopectina surgem também ligações α -(1,6) que contribuem para a estrutura mais ramificada da molécula (Figura 3) (Bamforth, 2003).

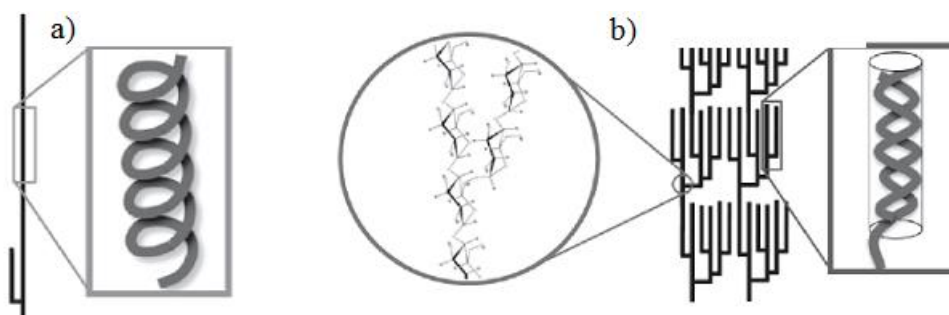


Figura 3. Representação esquemática das principais moléculas constituintes do amido: a) amilose e b) amilopectina (Adaptado de Ross, 2012).

O amido encontra-se armazenado nas células do endosperma sob a forma de grânulos (Figura 4) que diferem no seu tamanho e na proporção de amilose e amilopectina. Podem ser identificados dois tipos de grânulos de amido na cevada: grânulos do tipo A, que possuem maior dimensão, e grânulos do tipo B, que são mais pequenos. Os grânulos do tipo A contêm cerca de 70 a 80% de amilopectina, enquanto os grânulos do tipo B têm entre 20 a 60% de amilopectina (Evers *et al.*, 1999).

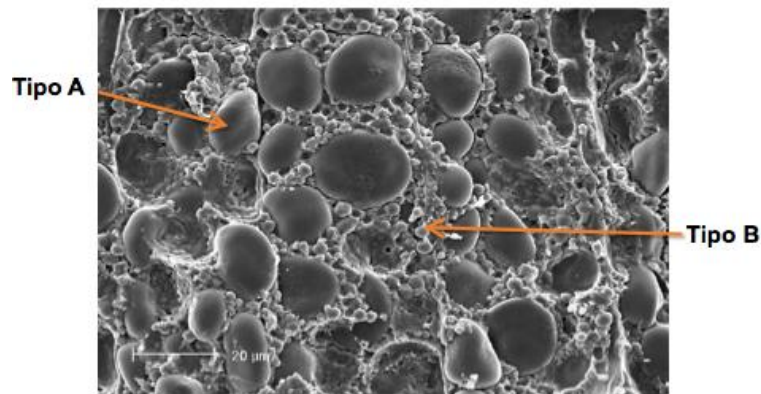


Figura 4. Organização do amido em grânulos do tipo A e grânulos do tipo B (Adaptado de MacGregor & Matsuo, 1982).

Como foi referido, os grânulos de amido encontram-se envolvidos por uma matriz proteica que é uma importante fonte de azoto para o embrião, durante a etapa de germinação (Fox, 2010). Esta matriz proteica é fundamentalmente composta por proteínas de reserva, nomeadamente hordeínas e glutelinas. As hordeínas são as principais proteínas de reserva, contribuindo com cerca de 40-50% da proteína total do grão (Fox, 2010). As hordeínas são solúveis em soluções aquosas etanólicas, por exemplo a 60-70%, enquanto as glutelinas são insolúveis em água, soluções salinas e etanólicas, podendo-se, no entanto, solubilizar em soluções ácidas ou alcalinas diluídas (Koehler & Wieser, 1996). No entanto, vários estudos têm vindo a mostrar que algumas frações de glutelinas são insolúveis em soluções ácidas diluídas e que a sua estrutura primária é destruída quando se realizam extrações com soluções alcalinas fortes. Deste modo, tornou-se relativamente frequente a utilização de solventes contendo misturas de álcoois (propanol a 50%), agentes redutores (Reagente de Cleland) ou agentes desagregantes (ureia).

As hordeínas têm sido bastante estudadas, podendo ser classificadas de acordo com vários critérios, tais como a sua mobilidade electroforética (Tatham & Shewry, 1995), o seu peso molecular (Wieser, 1994) e de acordo com o seu peso molecular e conteúdo em enxofre (Shewry & Tatham, 1990). Vários estudos demonstraram a importância destas proteínas ao nível da dureza do grão de cevada (Brennan *et al.*, 1998), quantidade de extracto (Skerritt & Janes, 1992; Janes & Skerritt, 1993), espuma e turbidez da cerveja (Sheehan & Skerritt, 1997; Robinson *et al.*, 2007).

Os grânulos de amido, bem como a matriz proteica que os envolve, encontram-se no interior das células do endosperma cujas paredes são constituídas por diversos polissacarídeos não amiláceos, tais como as β -glucanas (cerca de 70%) e as

arabinoxilanas (cerca de 15%). Do ponto de vista estrutural, as β -glucanas são um polímero linear formado por resíduos de D-glucose ligados entre si por ligações glicosídicas β -(1,3) e β -(1,4). As arabinoxilanas consistem em cadeias formadas por resíduos de D-xilose ligados por ligações glicosídicas β -(1,3), onde se ligam resíduos de L-arabinose. As paredes celulares funcionam como uma barreira física que limita o acesso das enzimas aos grânulos de amido e à matriz proteica que os rodeia. Para além disso, quando as paredes celulares não são convenientemente hidrolisadas durante o processo de maltagem, podem surgir problemas de viscosidade e de turbidez na cerveja, que poderão tornar a produção mais demorada e dispendiosa (Izydorczyk & MacGregor, 2000; Jin *et al.*, 2004).

O processo de maltagem

O processo de maltagem pode ser descrito, de uma forma bastante sucinta, como consistindo na germinação e secagem controladas do grão de cevada (Figura 5). No entanto, a maltagem é um processo bastante mais complexo.

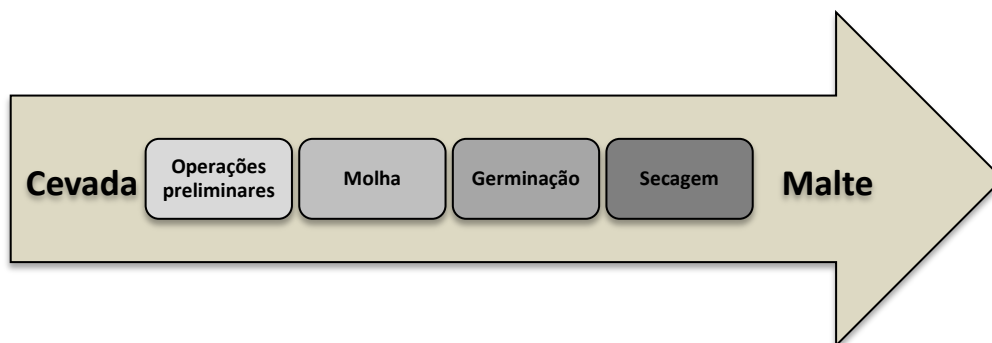


Figura 5. Esquema do processo de maltagem ilustrando as etapas da transformação da cevada em malte.

A maltagem propriamente dita inicia-se com a cevada limpa, classificada e com um teor de humidade de cerca de 11-12%. Deste modo, é necessária a realização de uma série de operações preliminares, tais como limpeza, classificação e secagem. Caso o teor de humidade da cevada após a colheita seja superior a 11-12% é conveniente a sua prévia secagem. A secagem da cevada deve ser realizada utilizando ar a temperatura inferior a 50-60 °C, para evitar a perda do potencial germinativo do grão. A limpeza tem como finalidade eliminar todo o tipo de material estranho que possa estar misturado com os grãos de cevada. Podem ser outro(s) tipo(s) de grãos de cereal, material vegetal diverso, pedras, poeiras, etc...Os equipamentos utilizados para a limpeza do grão de cevada

baseiam-se nas diferenças de tamanho, forma e densidade entre o grão de cevada e os materiais estranhos que se pretendem remover. Entre os vários equipamentos utilizados para a limpeza do grão de cereal podemos referir as mesas de gravidade, os peneiros e os separadores de discos. Também é frequente a utilização de separadores magnéticos para a remoção de materiais metálicos que eventualmente possam ter ficado na massa de cereal colhido no campo. Outra operação preliminar que é realizada antes da maltagem propriamente dita é a calibração. A calibração tem por objectivo a separação dos grãos de cevada de acordo com o seu tamanho para garantir que a massa de grãos de cevada que vão ser submetidos ao processo de maltagem é uniforme no que diz respeito ao seu tamanho. Deste modo, poderão ser evitadas situações de germinação do grão de cevada antes, ou depois do pretendido, garantindo um comportamento mais homogéneo dos grãos ao longo de todo o processo de maltagem

A etapa de molha tem por objectivo principal o aumento do teor de humidade do grão de cevada até cerca de 40-46% (CMBTC, 2012a). O aumento do teor de humidade do grão de cevada é crucial, uma vez que vai possibilitar o início da germinação do embrião e a correspondente produção de ácido giberélico, o transporte e ação do ácido giberélico na camada de aleurona e a hidratação do endosperma até valores que facilitam a sua modificação enzimática. Simultaneamente, a molha também permite uma limpeza adicional do grão de cevada. A etapa de molha começou por realizar-se através de uma única imersão do grão de cevada durante um determinado período de tempo. Atualmente, a molha é realizada mediante a alternância de períodos de imersão com períodos de repouso do grão (Figura 6), durante um período que pode chegar até 48 horas. É frequente a utilização de 3 períodos de imersão alternados com 3 períodos de repouso. Os períodos de repouso têm como objectivo a remoção do dióxido de carbono produzido durante o processo de respiração do grão de cevada e a sua substituição por ar e, conseqüentemente, oxigénio. Durante a etapa de molha a água começa a entrar no grão de cevada a partir do embrião, começando, de seguida, a hidratação da camada de aleurona e, posteriormente, a lenta hidratação do endosperma.

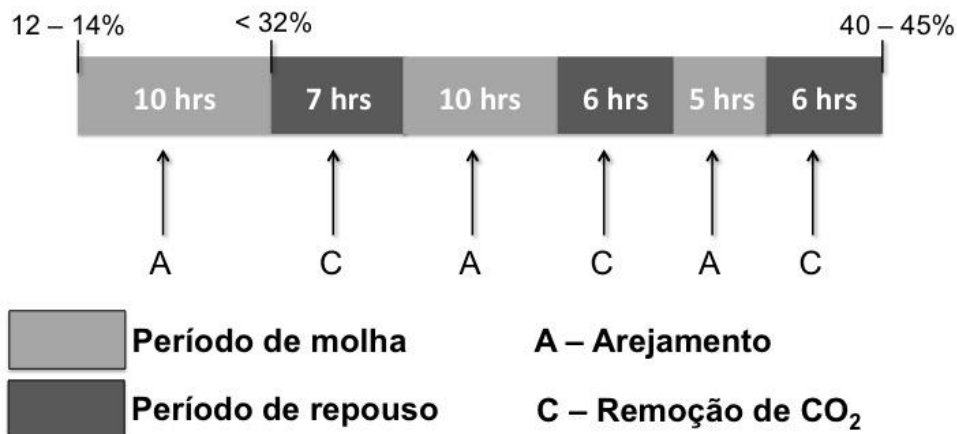


Figura 6. Esquema da etapa de molha para uma tina de fundo plano (Adaptado de GBS, 2015).

Podem ser utilizados alguns aditivos durante a etapa de molha: hidróxidos de cálcio e sódio (0,05 até 0,1%), para favorecer a extração de compostos fenólicos; formaldeído (0,05 a 0,1%), para controlo de microorganismos; peróxido de hidrogénio (0,1 a 1,0%), para auxiliar a oxigenação, entre outros (Palmer, 2006). A temperatura durante a etapa de molha deve ser rigorosamente controlada, devendo situar-se entre os 12-20 °C. Frequentemente, utilizam-se temperaturas de 16 °C, o que parece favorecer as modificações iniciais do grão durante a etapa de germinação, tornando-as mais rápidas e homogéneas (Palmer, 2006). A etapa de molha é realizada em tinas de molha, que podem ter fundo plano ou fundo cónico (Figura 7).



Figura 7. Tinas de molha de a) fundo cónico e de b) fundo plano (Adaptado de CMBTC, 2012b).

A etapa seguinte no processo de maltagem é a germinação, que tem como objectivo a produção equilibrada de enzimas com a mínima perda de extracto. Durante a germinação ocorrem importantes transformações físicas no grão de cevada, nomeadamente o crescimento da radícula e da plúmula (Figura 8).

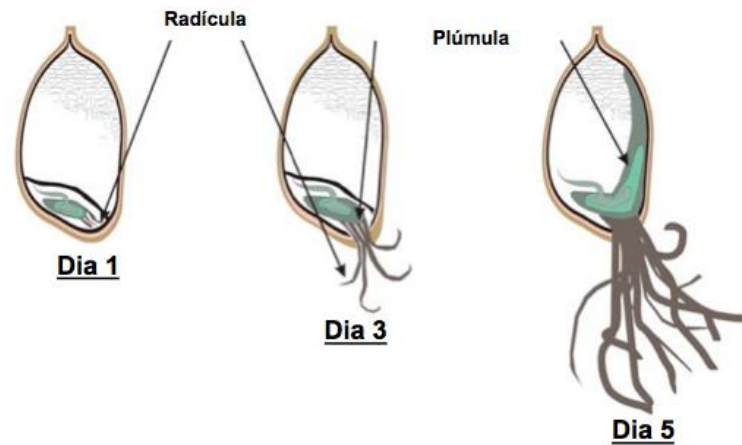


Figura 8. Crescimento da plúmula e radícula ao longo da etapa de germinação do grão de cevada (Adaptado de Daltraining, 2015).

Para além das transformações já descritas, no interior do grão os açúcares do embrião são utilizados para a produção de hormonas vegetais, como o ácido giberélico, que estimulam a produção de enzimas pelo embrião e pela camada de aleurona. As enzimas produzidas são transportadas até ao endosperma, onde irão atuar sobre as paredes celulares, os grânulos de amido e a matriz proteica que os envolve.

Entre as enzimas produzidas, é importante destacar as amilases, as β -glucanases e as proteases. As amilases atuam ao nível do principal constituinte do endosperma, o amido (Figura 9).

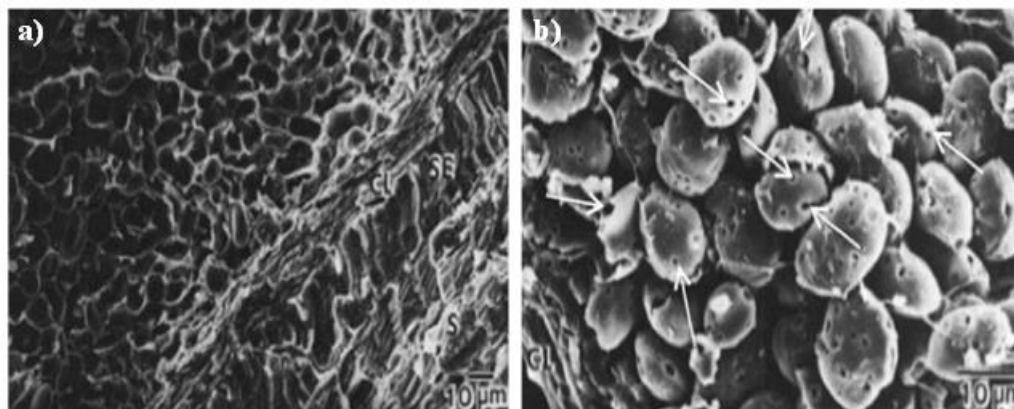


Figura 9. Grânulos de amido **a)** antes e **b)** após a ação das amilases (Adaptado de MacGregor & Matsuo, 1982).

Entre estas enzimas, encontramos as α - e β -amilases que atuam ao nível das ligações glicosídicas α -(1,4) que ligam os resíduos de D-glucose que compõem o amido. A α -amilase atua ao acaso no interior das moléculas de amilose e amilopectina,

produzindo dextrinas, enquanto a β -amilase atua a partir do extremo não redutor das cadeias, libertando moléculas de maltose (Hoseney, 1991).

Para além das amilases, existem outras enzimas, como as proteases, que também atuam ao nível dos componentes do endosperma, neste caso sobre a matriz proteica. As proteases desempenham um papel importante durante a etapa de germinação, verificando-se um forte aumento na atividade proteolítica a partir do 3º dia de germinação (Bathy, 1969; Wrobel & Jones, 1992). O aumento da atividade proteolítica resulta da ação conjunta de dois tipos de enzimas: as *endo*-proteases fornecem polipeptídeos solúveis que serão hidrolisados pelas *exo*-proteases a aminoácidos simples (Wrobel & Jones, 1992), que são utilizados pelo embrião. A ação das proteases durante a maltagem também parece influenciar algumas características da cerveja, tais como a sua turbidez, que é reduzida devido à ação destas enzimas.

A ação das enzimas já referidas não seria possível sem as β -glucanases, que desempenham um papel fundamental durante o processo de maltagem, e em particular durante a etapa de germinação. Estas enzimas são as responsáveis pela degradação das β -glucanas presentes nas paredes das células do endosperma (Figura 10).

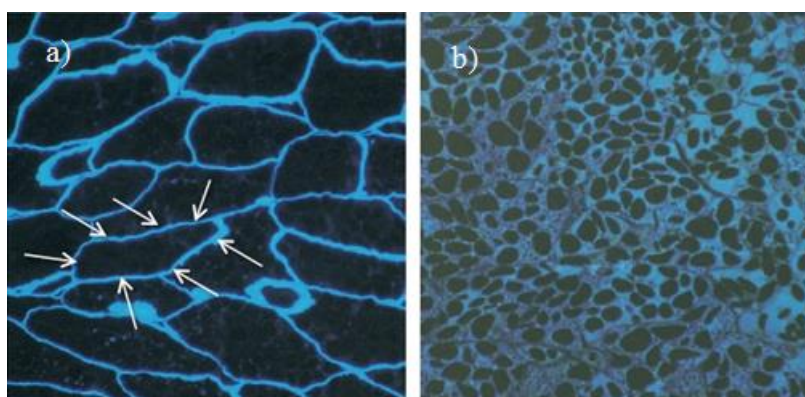


Figura 10. Células do endosperma a) antes e b) após a etapa de germinação, evidenciando a ação das β -glucanases (Adaptado de CMBTC, 2012a)

A sua ação vai permitir o acesso das restantes enzimas, tais como amilases e proteases, aos componentes que se encontram no interior das células do endosperma. Para além disso, a presença de componentes não degradados das paredes celulares, como as β -glucanas, pode conduzir a problemas de viscosidade e turbidez, que poderão implicar perdas de tempo e maiores custos de produção (Izydorczyk e MacGregor, 2000; Jin *et al.*, 2004).

A etapa de germinação é realizada em caixas ou tanques de germinação (Figura 11), a uma temperatura de cerca de 14-20 °C e mantendo o grão com um teor de humidade de cerca de 45% (CMBTC, 2012b).



Figura 11. Equipamentos utilizados para a realização da etapa de germinação: a) caixas e b) tanques (Adaptado de Maltibérica, 2009 e GBS, 2015)

Os locais onde é realizada a germinação possuem um pavimento perfurado para permitir a circulação de ar através dos grãos de cevada. A circulação de ar permite o controlo da temperatura e humidade durante a germinação, para além de possibilitar a remoção do dióxido de carbono formado devido à respiração do grão e o fornecimento de oxigénio para a realização do mesmo processo. Os equipamentos utilizados também dispõem de dispositivos mecânicos para revolverem periodicamente o grão e, deste modo, contribuirão para a homogeneização do perfil de humidade e temperatura ao longo da germinação.

A etapa final do processo de maltagem é a secagem e tem como principal objectivo parar a germinação do grão de cevada, através da redução do seu teor de humidade desde cerca 43% até 5%. Para além disso, a secagem inativa microrganismos, o que, em conjunto com a redução do teor de humidade, permite fornecer um produto estável do ponto de vista da sua conservação. As enzimas sintetizadas na etapa de germinação são sensíveis a elevadas temperaturas quando o teor de humidade do grão é elevado. Deste modo, na fase inicial da secagem deve utilizar-se ar a uma temperatura próxima de 50 °C (Figura 12). Durante esta fase (Fase 1 da Figura 12), o ar utilizado para a secagem deve ter uma humidade relativa de 100%, ou bastante próxima deste valor. O teor de humidade do grão é reduzido, a uma velocidade constante, desde o seu valor inicial até cerca de 20%.

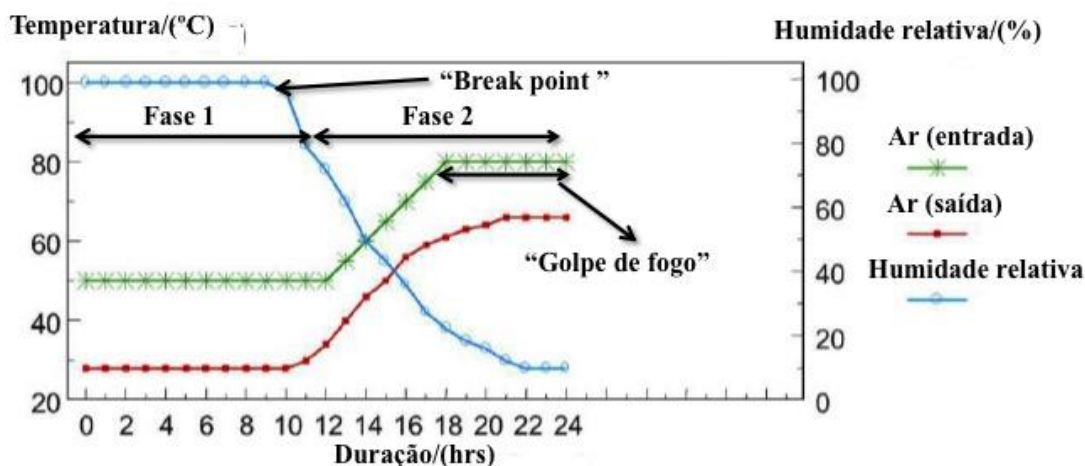


Figura 12. Evolução do teor de humidade e temperatura do ar de entrada, bem como da temperatura de saída do ar ao longo da etapa de secagem (Adaptado de GBS, 2015).

Durante a fase seguinte (Fase 2 da Figura 12), a velocidade de secagem diminui, sendo necessário aumentar a temperatura do ar de entrada para se conseguir reduzir o teor de humidade do grão até valores próximos dos 5%. Na parte final desta fase, mantém-se o valor da temperatura constante durante um determinado período de tempo (é o chamado “golpe de fogo”). O valor da temperatura vai depender do tipo de malte que se pretende obter: cerca de 80-85 °C, para os chamados maltes “pale”, ou cerca de 100 °C para os maltes designados “ale” (CMBTC, 2012b).

Durante a etapa de secagem, o malte vai desenvolvendo uma coloração que se deve à formação de melanoidinas, como resultado das reacções de Maillard que ocorrem entre os produtos de degradação enzimática do amido e proteínas, nomeadamente açúcares redutores e aminoácidos (Palmer, 1989). Durante a etapa de secagem, a atividade enzimática é reduzida de uma forma significativa, havendo mesmo destruição das enzimas mais sensíveis à temperatura. Deste modo, de uma forma geral, quanto mais intensa for a coloração do malte, menor será a sua atividade enzimática (Tabela 1). Nos chamados maltes base, como o Ale e o Lager, é desejável a manutenção de um nível adequado de atividade enzimática. No entanto, existem alguns maltes, designados de maltes especiais, que possuem colorações mais intensas, como o Amber/Brown e o Chocolate, onde a atividade enzimática é totalmente destruída, como resultado das elevadas temperaturas utilizadas na fase final da etapa de secagem. Existem maltes especiais, como é o caso do Light Crystal e do Crystal, que também possuem uma coloração mais intensa do que a dos maltes bases e que não têm actividade enzimática, mas que não foram obtidos com secagem a elevada temperatura. De facto, ao contrário

dos outros maltes referidos, estes maltes especiais são obtidos submetendo o malte a temperaturas de cerca de 75 °C imediatamente após a sua germinação, o que vai contribuir para a inativação das enzimas. Os maltes especiais são utilizados em conjunto com um malte de base, com o objectivo de conferir uma coloração mais intensa à cerveja, para além de sabores característicos.

Tabela 1- Características de diferentes maltes de base e maltes especiais (Adaptado de Palmer, 2006).

	Humidade (%)	Cor °EBC	Actividade enzimática	Temperatura final de secagem °C
Ale	4,0	5,0	sim	100
Lager	4,5	2,0	sim	80
Light Crystal^a	7,0	25-35	não	75
Crystal^a	4,0	100-300	não	75
Amber/Brown^a	2,0	100-140	não	150
Chocolate^a	1,5	900-1100	não	220

Referências

- Bamforth, C.W. 2003. Barley and malt starch in brewing: a general review. *Technical Quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, 40, 89-97.
- Bhatty, R.S. 1969. Note on the development of proteolytic enzymes in germinating barley. *Cereal Chemistry*, 47, 74-77.
- Brennan, C.S., Smith, D.B., Harris, N., Shewery, P.R. 1998. The production and characterisation of Hor3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *Journal of Cereal Science*, 28, 291-299.
- Briggs, D.E. 1978. *Barley*. Chapman & Hall, 1-38.
- Canadian Malting Barley Technical Center 2012a. Malting canadian barley: chemistry. In: CMBTC (Ed.) - *Canadian Barley Malting and Brewing Technical Guide*, 17-20.
- Canadian Malting Barley Technical Center 2012b. Malting with canadian barley. In: CMBTC (Ed.) - *Canadian Barley Malting and Brewing Technical Guide*, 21-24.
- Daltraining, 2015. Raw materials. Disponível em <http://www.daltraining.eu/PDF/rawmaterials/section1Rawmaterials.pdf> (consulta em julho de 2015).
- Evers, A.D., Blakeney, A.B., O'Brien, L. 1999. Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 629-650.
- Fox, G.P. 2010. Chemical composition in barley grains and malt quality. In: Zhang, G., Li, C. (Ed.) - *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Springer Berlin Heidelberg, 63-98.

- GBS (Global Beverage Solutions) 2015. The malting process. Disponível em http://www.gbsinfo.com/siteresources/uploads/1181158_2_malting_process1181158.pdf (consulta em julho de 2015).
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., Gallghar, E. 2010. Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 318-328.
- Hockett, E.A. 2000. Barley. In: Kulp, K., Ponte Jr., J.G. (Ed.) - *Handbook of Cereal Science and Technology*. Marcel Dekker, Inc., 81-126.
- Hoseney, R.C. 1991. *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Editorial Acribia, S.A., 1-30.
- Izydorczyk, M.S., MacGregor, A.W. 2000. Evidence of intermolecular interactions of β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 41, 417-420.
- Janes, P. W., Skerritt, J.H. 1993. High performance liquid chromatography of barley proteins: relative quantities of hordeins fractions correlate with malt extract. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 77-84.
- Jin, Y.L., Speers, R.A., Paulson, A.T., Stewart, R.J. 2004. Barley β -glucan and their degradation during malting and brewing. *Technical Quaterly-Master Brewers Association of the Americas*, 41, 231-240.
- Koehler, P., Wieser, H. 1996. Chemistry of cereal grains. In: Lásztity, R. (Ed.) - *Chemistry of Cereal Proteins*, 11-45.
- Lewis, M.J., Young, T.W. 1995. *Brewing*. Chapman & Hall, 233-250.
- MacGregor, A.W., Matsuo, R.R. 1982. Starch degradation in endosperms of barley and wheat kernels during initial stages of germination. *Cereal Chemistry* 59, 210-216.
- Maltibérica, 2009. Manual de boas práticas agrícolas. Disponível em http://agrogestao.com/ficheiros/Maltiberica_Manual_Boas_Praticas_Agricolas_web.pdf (consulta em julho de 2015).
- Meredith, W.O.S., Anderson, J.A., Hudson, L.E. 1962. Evaluation of malting barley. In: Cook, A.H. (Ed.) - *Barley and Malt. Biology, Biochemistry and Technology*. Academic Press, 207-270.
- Munck, L. 1981. Barley for food, feed and industry. In: Pomeranz, Y., Munck, L. (Ed.) - *Cereals: a Renewable Resource, Theory and Practice*. American Association of Cereal Chemists, 427-459.
- Olkku, J., Kotaviita, E., Salmenkallio-Martilla, M., Sweins, H., Home, S. 2005. Conection between structure and quality of barley husk. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63, 17-22.
- Palmer, G.H. 1983. Malting and mashing. In: *An Introduction to Brewing and Science Technology*. The Institute of Brewing, 10-27.
- Palmer, G.H. 1989. *Cereal Science and Technology*. Aberdeen University Press, 61-242.
- Palmer, G.H. 2006. Barley and malt. In: Priest, F.G., Stewart, G.G. (ed.) - *Handbook of Brewing*. CRC Press, 139-160.
- Robinson, L., Juttner, J. , Milligan, A., Lahnstein, J. , Eglinton, J.K., Evans, D.E. 2007. The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability:

- cloning and characterisation of the barley SE protein as a barley trypsin inhibitor of the chloroform/methanol type. *Journal of Cereal Science*, 45, 343-352.
- Ross, A.S. 2012. Starch in foods. In: Wrolstad, R.E. (Ed.) - *Food Carbohydrate Chemistry*. Wiley-Blackwell, 107-134.
- Sheehan, M.C., Skerritt, J.H. 1997. Identification and characterisation of beer polypeptides derived from barley hordeins. *Journal of the Institute of Brewing*, 107, 297-306.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemistry Journal*, 267, 1-12.
- Skerritt, J.H., Janes, P.W. 1992. Disulphide-bonded "gel protein" aggregates in barley: quality-related differences in composition and reductive dissociation. *Journal of Cereal Science*, 16, 219-235.
- Tatham, A.S., Shewry, P.R. 1995. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science*, 22, 1-16.
- Wieser, H. 1994. Cereal protein chemistry. In: Feighery, C., O'Farrelly, C. (Ed.) - *Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease*. Oak Tree Press, 191-202.
- Wrobel, R., Jones, B.L. 1992. Electrophoretic study of substrate and pH dependence on endoproteolytic enzymes in green malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 98, 471-478.

Leveduras e fermentações: O caso da cerveja

Leticia M. Estevinho¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança; Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança

Resumo

A cerveja é uma bebida milenar, que resulta da fermentação alcoólica, por atividade de leveduras selecionadas do género *Sacharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual são adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável.

As leveduras têm grande importância na produção de cerveja devido aos distintos processos metabólicos levados a cabo por estes microrganismos. Na presença de oxigénio, apresentam uma taxa de crescimento elevada e originam como produto do seu metabolismo o dióxido de carbono. Já em condições de anaerobiose, observa-se uma taxa de crescimento mais baixa, e os produtos obtidos são o dióxido de carbono e o etanol. A classificação da levedura cervejeira baseia-se essencialmente no seu comportamento floculante.

Este trabalho aborda a importância das leveduras na produção da cerveja, identifica os perigos inerentes ao processo de fabrico e sugere medidas de controlo.

Palavras-chave: bebidas alcoólicas; cerveja; fermentação; microbiologia.

Introdução

A cerveja é uma bebida carbonada de teor alcoólico entre 3 e 8% (v/v), produzida através da fermentação de um mosto composto por malte de cevada, lúpulo e água, sendo ainda possível utilizar outras matérias-primas como arroz, milho e trigo (Brányik et al., 2012). O sabor desta bebida alcoólica é influenciado não só pelas matérias-primas utilizadas, mas também pelo tipo de processo e levedura utilizada, bem como pelos compostos produzidos durante a fermentação e maturação (Carvalho et al., 2006).

A produção de cerveja constitui uma importante fonte de rendimento em Portugal, que se assume como o 14º na lista dos produtores mundiais, com mais de 7.000 mil hectolitros por ano. Adicionalmente, estatísticas publicadas pelo "The Brewers of Europe" evidenciam o crescimento acentuado dos pequenos produtores nacionais,

especialmente de cervejas artesanais: em 2008 não havia nenhum micro-produtor, em 2012 existiam 3, em 2013 estavam já 12 registados.

Microbiologia de Fermentações

As leveduras são organismos eucariotas incluídos no domínio Eucarya, Reino Fungi. Estes organismos possuem um papel relevante na indústria alimentar, nomeadamente no sector da panificação, na vinificação e na produção de bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas. Contudo, a sua presença pode também estar associada a deteriorações nos alimentos e bebidas, o que se traduz em avultadas perdas económicas (Ribéreau-Gayon, 2006).

No contexto das fermentações alcoólicas, tem sido reportada na literatura a utilização de vários géneros tais como *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* e *Dekkera*, destacando-se pela sua importância o género *Saccharomyces* (Badotti et al., 2014; Pereira et al., 2015).

A fermentação alcoólica realizada pelos microrganismos é um processo de obtenção de energia em que os açúcares são os dadores iniciais de electrões e o acetaldeído o receptor final (Ribéreau-Gayon, 2006). Ainda que os produtos finais desta via metabólica sejam o álcool e o dióxido de carbono, importa referir a produção em pequenas quantidades de metabolitos secundários, como o acetato de etilo, o ácido cítrico e succínico e o álcool isoamílico. A concentração destes compostos, determinantes para as características organolépticas específicas dos produtos fermentados, varia de acordo com os microrganismos envolvidos e com as características do processo fermentativo (Pereira et al., 2015).

O caso da cerveja

Enquadramento histórico

A produção de bebidas alcoólicas é uma das atividades mais antigas desenvolvidas pelo homem. No caso particular da cerveja, a sua produção remonta há milhares de anos, na região da Mesopotâmia (Swinnen, 2011). Para a produção desta bebida, a cevada era deixada de molho até germinar, moída e moldada em pequenos bolos, procedendo-se, de seguida, à adição da levedura (Damerow, 2012).

Ao longo da história, a produção desta bebida alcoólica tem sido alvo de vários aprimoramentos técnicos que permitiram otimizar a metodologia, melhorar a qualidade do produto, bem como ampliar o leque de cervejas disponíveis (John, 2005).

Na idade média, o lúpulo foi introduzido como matéria-prima e iniciou-se a produção em larga escala. Nesta época, utilizavam-se ainda diferentes cereais na elaboração da cerveja, tendência que foi apenas revertida por aquele que é considerado o mais antigo regulamento relativo à manipulação de alimentos - a Lei Alemã de Reinheitsgebot - que estipulava a utilização exclusiva de cevada, lúpulo e água como matérias primas (Patterson e Hoalst-Pullen, 2014).

Embora o processo cervejeiro tenha mais de 7000 anos, os desenvolvimentos científicos que mais impacto tiveram na produção ocorreram maioritariamente nos últimos 150 anos e integram conhecimentos de várias áreas, designadamente da engenharia, bioquímica e microbiologia.

De facto, vários estudos conduzidos nas últimas décadas forneceram soluções para muitos problemas inerentes à fermentação da cerveja, sendo as cervejarias atuais estruturadas de acordo com métodos e processos bem estabelecidos e utilizando equipamentos especificamente idealizados.

Entre as modificações no sector da produção e diversificação da cerveja, salientam-se a utilização de processos de fermentação contínua, de mostos concentrados (com elevadas concentrações iniciais de açúcares) e a manipulação genética da cevada e da levedura (Dragone et al., 2007).

Estas mudanças tecnológicas traduziram-se na redução dos custos de produção, na melhoria da qualidade e na manutenção das propriedades benéficas do produto, com consequências relevantes no rendimento económico do sector (Preedy, 2011; Damerow, 2012).

Atualmente são diversos os tipos de cerveja disponíveis no mercado, diferindo na composição e quantidade das matérias-primas utilizadas, nas etapas seguidas, equipamentos e processos empregues durante o processamento (Tomáš et al., 2012).

Tipos de cerveja

Existem vários tipos de cerveja classificados com base em características como: i) o extrato primitivo; ii) a cor; iii) o teor alcoólico; iv) proporção de malte e cevada e v) tipo de fermentação (Oliver e Colicchio, 2011).

Relativamente ao extrato do mosto de malte utilizado, classificam-se em cerveja leve (extrato primitivo $\geq 5\%$ e $< 10,5\%$ em peso), cerveja comum ($10,5\% \leq EP < 12,5\%$), cerveja extra ($12,5\% \leq EP < 14,0\%$) e cerveja forte ($EP \geq 14,0\%$).

Quanto à cor, distingue-se a cerveja clara, cuja cor corresponde a menos de 20 unidades European Brewery Convention (EBC) e a cerveja escura, com 20 ou mais unidades EBC.

Tendo em conta o teor alcoólico do produto final, classificam-se em: cerveja sem álcool, quando o conteúdo em álcool é inferior a 0,5% em volume; e cerveja com álcool, sempre que o teor alcoólico é superior a esse limite. De referir que dentro do último [grupo é ainda feita a subdivisão em cerveja de baixo teor alcoólico (de 0,5 até 2,0% de álcool), de teor alcoólico médio (de 2 até 4,5%) e alto (de 4,5 a 7% de álcool).

Quanto à percentagem de malte dividem-se em: cerveja puro malte, em que a fonte de açúcares é 100% malte de cevada sobre o extrato primitivo; cerveja, em que a proporção de malte de cevada é igual ou superior a 50%; e cerveja com nome do vegetal predominante: $20 \leq MC < 50\%$ sobre o extrato primitivo.

Por fim, considerando o tipo de levedura e a sua performance fermentativa, é possível distinguir três principais categorias Ales, Lagers e Lambics, sendo ainda feita referência por parte de alguns autores a um quarto tipo - das cervejas híbridas, cuja fermentação é mista (BJCP, 2014). As cervejas da família Ale, antigamente consideradas “cervejas de alta fermentação” são produzidas utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com temperaturas entre 15 e 25°C (Vidgren et al., 2010). Neste tipo de cerveja as leveduras atingem a superfície e são geradas concentrações superiores de ésteres e outros compostos aromáticos, o que justifica a maior complexidade das características organolépticas do produto final (Viroli et al., 2015). Por outro lado, as cervejas Lager, “cervejas de baixa fermentação” na terminologia antiga, geralmente tem um perfil menos aromático e são produzidas pela levedura *Saccharomyces pastorianus*, numa faixa de temperaturas compreendida entre 6 e 14°C (Vidgren et al., 2010). Adicionalmente, existem as cervejas de fermentação espontânea, dotadas de um acentuado aroma ácido, que são comumente obtidas em barris de madeira utilizando leveduras do género *Brettanomyces* e bactérias lácticas e acéticas existentes no ambiente (BJCP, 2014).

Produção de cerveja

As principais matérias-primas para o fabrico de cerveja são água, cevada maltada, lúpulo e levedura. Outros cereais, quer maltados quer não maltados, na forma de farinhas

ou enquanto grãos inteiros, podem também ser utilizados, já que conferem ao produto características particulares. Adicionalmente, pode recorrer-se a adjuvantes de fermentação, como antioxidantes, acidulantes, estabilizantes e compostos antiespumantes.

O malte, principal fonte de extracto, é obtido a partir da cevada sujeita a um processo de germinação, designado maltagem. Existem vários tipos de malte, dependendo das condições de humidade e temperatura a que é realizada a maltagem, o que influencia a cor e aroma característicos das diferentes cervejas.

A água é a matéria-prima mais importante por ser o principal componente da cerveja, sendo as suas características físico-químicas fundamentais para a qualidade do produto, principalmente o perfil de minerais.

O lúpulo é uma planta da espécie *Humulus lupulus* que confere à cerveja o amargor e aroma característicos. Os componentes responsáveis pelo sabor amargo são as resinas (principalmente os ácidos α e β), enquanto os óleos essenciais contribuem maioritariamente para o aroma. O lúpulo contribui ainda para reduzir a formação de espuma e, devido às suas propriedades antibacterianas, previne a ocorrência de contaminações. De salientar que, por oposição ao malte, não influencia o teor alcoólico do produto final (Morado, 2009)

A produção desta bebida alcoólica é um processo biotecnológico, dividido em três etapas principais, dentro dos quais devem ser cumpridos vários procedimentos: i) produção do mosto; ii) processo fermentativo e iii) acabamento.

O primeiro passo na obtenção do mosto cervejeiro consiste na moagem do grão de malte, após brassagem, sendo a fração de sólidos insolúveis removida por filtração. Segue-se a ebulição do mosto, etapa em que é adicionado o lúpulo, já que a elevada temperatura aumenta a estabilidade bioquímica, biológica e coloidal, a par de promover a aquisição da cor, aroma e sabor, decorrentes da concentração do extrato.

Esta fase permite ainda a eliminação de substâncias voláteis indesejáveis, a precipitação de proteínas de elevado peso molecular e a diminuição da carga microbiana do mosto.

O mosto é então arrefecido e arejado, procedendo-se à inoculação da levedura (Morado, 2009). O mosto cervejeiro é constituído principalmente por hidratos de carbono, designadamente sacarose, frutose, glicose, maltose e maltotriose, bem como por dextrinas.

A fase da fermentação, durante a qual os açúcares do mosto são transformados em álcool e dióxido de carbono por ação da levedura inoculada, é conduzida a temperaturas

controladas e tem a duração média de 7 dias. O primeiro passo na utilização dos açúcares fermentescíveis pela levedura pode consistir na passagem intacta destes através da membrana celular ou na hidrólise extracelular, seguida da entrada na célula de alguns produtos da hidrólise. A maltose e a maltotriose atravessam diretamente a membrana, enquanto a sacarose é hidrolisada a nível extracelular em glicose e frutose, produtos já metabolizados pela célula (Brányik et al., 2012). Geralmente, as leveduras utilizadas na produção de cerveja metabolizam glicose, frutose, maltose e maltotriose, sendo que as dextrinas são utilizadas apenas por *S. diastaticus*, uma variedade de *S. cerevisiae* (Russel, 1994).

Tradicionalmente, a terceira etapa consiste na maturação, clarificação e carbonatação do produto, essenciais para melhorar as características sensoriais da bebida, bem como para assegurar um adequado tempo de “vida de prateleira”. Finalmente, procede-se ao enchimento, podendo a cerveja ser acondicionada em diferentes embalagens. Antes ou após o enchimento é necessário proceder à estabilização biológica da cerveja, que pode ser efetuada a frio, através da filtração esterilizante, ou a quente, recorrendo-se à pasteurização. Relativamente a este procedimento, importa distinguir a pasteurização realizada imediatamente antes do embalamento, designada pasteurização flash; ou após, referida como pasteurização túnel.

Melhoramento genético e molecular das leveduras

Avanços importantes foram atingidos usando a tecnologia de DNA recombinante que tem como objetivo melhorar as características das leveduras utilizadas na produção de cerveja. De facto, a introdução de leveduras recombinantes na indústria alimentar permitiu aumentar a eficiência e o rendimento do processo fermentativo, com importantes consequências em termos de custos.

Entre as vários benefícios das estratégias de transformação, destaca-se a introdução de leveduras capazes de fermentar uma ampla variedade de açúcares, com tolerância superior ao stress químico e físico causado pela fermentação, que floculam apropriadamente e apresentam tempos de fermentação significativamente menores. Como consequência, viabilizou-se a obtenção de cervejas que, para além de mais estáveis, possuem características sensoriais mais apreciadas pelos consumidores.

Com efeito, tem sido referido na literatura que a utilização de leveduras geneticamente modificadas permite que a concentração de diacetil seja inferior ao limiar

de detecção sensorial, facilita a filtração e permite a produção de cervejas com teores de hidratos de carbono mais reduzidos (Patterson e Hoalst-Pullen, 2014).

Apesar das vantagens associadas, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante é dificultada pela exigente e morosa aprovação do uso por parte das entidades competentes, sendo requerida uma completa demonstração não só da sua eficácia, como da sua efetividade e, acima de tudo, da segurança.

Controlo microbiológico na produção de cerveja

A cerveja possui uma estabilidade microbiológica considerável e características desfavoráveis para a multiplicação de muitos microrganismos, o que é justificado, entre outros fatores, pela existência da fase de ebulição do mosto, muito importante na eliminação de contaminantes microbiológicos provenientes das matérias-primas, pelos efeitos antimicrobianos do álcool, pelo baixo pH, elevado teor em dióxido de carbono e ácidos do lúpulo.

Ainda assim, convém salientar que algumas espécies de bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*), Gram-negativas (*Pectinatus* e *Megasphaera*) e de leveduras selvagens (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*) são capazes de se multiplicar nesta bebida, conferindo-lhe características indesejáveis, tais como a formação de película, produção de turbidez e alterações sensoriais, com consequências na qualidade do produto final (Dragone et al., 2007).

A cerveja pode conter contaminantes microbianos provenientes de diversas fontes, classificando-se em: i) primários, quando são provenientes de matérias-primas, adjuvantes e materiais utilizados durante o processo de fabrico; ii) contaminantes secundários, introduzidos na cerveja durante o embalamento e distribuição, sendo a parcela correspondente a esta via significativamente inferior (Neto et al., 2010).

Atualmente, a deteção de microrganismos contaminantes é sobretudo feita através da análise do crescimento em meios de cultura apropriados. Contudo, é importante salientar que algumas espécies possuem crescimento fastidioso, sendo vantajoso o uso de métodos mais rápidos e específicos, independentes da proliferação.

A propósito dos requisitos de segurança e qualidade aplicáveis à cerveja, estão definidos na legislação portuguesa (DR nº2 de 3 de Janeiro de 1996) diversos limites, quer relativos aos valores de pH teores de acidez total e de acidez volátil, quer às concentrações admitidas de contaminantes minerais (tais como zinco, ferro, cobre,

chumbo e cobalto). Quanto aos parâmetros de contaminação microbiológica, atualmente dirigem-se quase em exclusivo à monitorização da qualidade da água.

Considerações finais

A fermentação é a etapa mais importante de todo o processo cervejeiro, pois é a fase em que o mosto é transformado em cerveja por ação de leveduras.

Estes microrganismos podem ser classificados com base na sua capacidade floculante, em leveduras de fermentação alta e leveduras de fermentação baixa

Embora a cerveja seja considerada uma bebida segura, durante a sua produção podem ocorrer diversas contaminações, devendo o produtor estar preparado para prevenir estas situações.

Bibliografia

- Badotti, F., Vilaça, S. T., Arias, A., Rosa, C. A., Barrio, E. (2014). Two interbreeding populations of *Saccharomyces cerevisiae* strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. *FEMS yeast research*, 14(2), 289-301.
- BCJP - Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines (2015), disponíveis em http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf.
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczyński, M., Lehnert, R., & e Silva, J. B. A. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 493-506.
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczyński, M., Lehnert, R., & e Silva, J. B. A. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 493-506.
- Carvalho, B.M., Bento, C.V., Silva J.B.A (2006). Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. Artigo da Universidade de São Paulo. Departamento de Biotecnologia
- Damerow, P. (2012). Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient mesopotamia. *Cuneiform Digital Library Journal*, 2, 1-20.
- Diário da Republica Nº 2 de 3 de Janiro de 1996.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Silva, J.B. (2007) Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. *Ciencia e Tecnologia Alimentar*, 37- 40
- John, A. P. (2005). Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology. Reprint Edition by BeerBooks, Cleveland, OH.
- Lu, J., Dong, J., Wu, D., Chen, Y., Guo, X., Shi, Y., Xiao, D. (2012). Construction of recombinant industrial brewer's yeast with lower diacetyl production and proteinase A activity. *European Food Research and Technology*, 235(5), 951-961.

- Morado (2009). Larousse da cerveja – Larousse do Brasil, 1ª Edição.
- Neto, O. C., de Sousa Ribeiro, K. C., Neto, O. J. O., & Rogers, D. (2015). Avaliação das Performances das Práticas de Governança Corporativa: Uma Análise Multiperíodo em Empresas Listadas no Brasil. *RGC-Revista de Governança Corporativa*, 2(1).
- Oliver, G., olicchio, T. (2011). *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press
- Patterson, M. W., & Hoalst-Pullen, N. (2014). Geographies of Beer. In *The Geography of Beer* (pp. 1-5). Springer Netherlands.
- Pereira, A. F., Silva, P. H. A., Pinheiro, P. F., Braga, L. M., & Pinheiro, C. A. (2015). Adição de fontes de nitrogênio e duas linhagens de levedura na fermentação alcoólica para produção de cachaça. *Journal of Chemical Engineering and Chemistry*, 1(1), p-45.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2011). *Beer in health and disease prevention*. Academic Press.
- Ribéreau-Gayon, P. (2006). Handbook of Enology - Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. England: John Wiley & Sons Ed., p. 441.
- Russell, I., & Dowhanick, T. M. (1999). Rapid detection of microbial spoilage. In *Brewing Microbiology* (pp. 209-235). Springer US.
- Swinnen, J. F. (Ed.). (2011). *The economics of beer*. OUP Oxford.
- Vidgren, V., Multanen, J. P., Ruohonen, L., & Londesborough, J. (2010). The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS yeast research*, 10(4), 402-411.
- Viroli, S. L. M., Vieira, J. T. F., de Sousa, L. M. C. (2015). Produção e Análise de Cerveja Artesanal à Base de Milho. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 1(3).

A cultura do lúpulo em Bragança. Aspetos agronómicos inovadores e potencial e expansão

M Ângelo Rodrigues¹, Jorge Sá Morais²

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

²Unidade de Química Analítica – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

O lúpulo foi uma cultura de elevada importância na economia Nacional, apesar de a produção estar restringida a duas pequenas zonas de cultivo no norte de Portugal. Na década de 1970, a produção chegou a ultrapassar as necessidades da indústria cervejeira Nacional, tendo-se exportado lúpulo. Razões de conjuntura internacional desfavoráveis e um sistema produtivo que terá demorado a adaptar-se às novas exigências dos mercados nacional e internacional conduziram a cultura a uma importância económica residual. No presente cultiva-se lúpulo em duas explorações, num total de 12 ha. No entanto, Portugal tem boas condições ecológicas para produzir lúpulo. Se for possível reestruturar o setor e lançá-lo em bases tecnológicas mais competitivas, é possível voltar a ter um setor florescente em Portugal. Seria também importante intervir já, enquanto os dois produtores atuais pudessem partilhar os seus conhecimentos com novos produtores. Perdida esta fonte de conhecimento, a ilusão de voltar a haver em Portugal produção significativa de lúpulo reduz-se grandemente. Neste trabalho discutem-se alguns aspetos da adaptação ecológica do lúpulo à região norte de Portugal, avalia-se o potencial de expansão de cultura e os constrangimentos e lançam-se algumas ideias base sobre as quais deveria estar suportado o “novo” setor do lúpulo em Portugal.

Palavras-chave: adaptação ecológica; produtividade do lúpulo; *Humulus lupulus*; potencial de expansão; constrangimentos.

Adaptação da cultura do lúpulo à região de Bragança

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta perene bem adaptada ao frio (faz paragem de crescimento no Inverno). É considerada uma planta com necessidades de vernalização (durante o inverno deve ser submetida a 6 semanas de frio). As principais regiões produtoras de lúpulo na Europa têm temperaturas médias anuais de 8 a 10 °C (Rybáček, 1991), valores bastante baixos em comparação com as regiões portuguesas

produtoras de lúpulo. Contudo, o frio de inverno e de início de primavera em Portugal é adequado para a cultura, ou pelo menos para algumas cultivares, o que permite à planta atingir boas produtividades.

Aceita-se que a soma das temperaturas médias das máximas adequadas para o lúpulo é de 2500 a 3000 °C (Carrilho, 1981). Em Portugal estes valores são facilmente atingíveis. Sendo uma planta adaptada a regiões de clima fresco, a performance do lúpulo é penalizada por temperaturas elevadas. O crescimento é inibido quando as temperaturas ultrapassam 32 °C (Rybáček, 1991). Este aspeto pode justificar o facto do cultivo do lúpulo se ter iniciado em zonas frescas do Norte de Portugal e poderá restringir o seu cultivo a regiões mais a Sul ou com Verão mais quente. A insolação parece importante. A duração da insolação deve ser de 1600 a 2000 h de luz dependendo da cultivar (Rybáček, 1991). Em Portugal verificou-se haver uma boa relação entre a insolação do mês de junho e a produtividade (Trigueiro e Vasconcelos, 1981).

Em Portugal, o lúpulo surge espontaneamente na margem de cursos de água permanentes de regiões frescas. O lúpulo cultivado é, também ele, uma planta de elevadas necessidades em água, em resultado da exuberante superfície foliar que desenvolve (Figura 1). Estudos em lisímetros conduzidos na República Checa mostraram que o lúpulo consumiu 482 mm de água durante a estação de crescimento (Rybáček, 1991). Em Portugal, a precipitação durante a Primavera e Verão é manifestamente insuficiente para o desenvolvimento desta planta em sequeiro. O cultivo requer, por isso, abundante disponibilidade hídrica para rega. Em Portugal são utilizados aproximadamente 5000 m³ de água de rega por hectare (Carrilho, 1981).



Figura 1. Lúpulo espontâneo nas margens do rio Fervença junto à cidade de Bragança (esquerda) e campo de lúpulo cultivado (direita).

Para cultivar lúpulo os solos devem ter elevada espessura efetiva, textura franca, pH próximo da neutralidade, boa drenagem e se possível planos (Navarro et al., 1982). A profundidade do solo permite um bom desenvolvimento radicular da planta e a textura franca favorece o arejamento. Terrenos que acumulem água durante o inverno devem ter um plano de drenagem antes da instalação da cultura. Quando os solos não são naturalmente neutros, situação frequente no Norte de Portugal, o pH deve ser corrigido com a aplicação de calcários. A matéria orgânica do solo é também importante na medida em que favorece o arejamento, a retenção de água e reduz os riscos de compactação do solo e degradação da estrutura pela rega frequente, mobilizações e passagem das máquinas.

Produtividade do lúpulo

O lúpulo é uma espécie bem adaptada a algumas regiões de Portugal, incluindo Bragança. Pode encontrar-se lúpulo espontâneo nas margens de pequenos rios e ribeiras em várias regiões do Norte e Centro do país. A produtividade do lúpulo cultivado pode ser considerada elevada, mesmo comparando com os valores que se registam nos melhores países produtores. Na região de Bragança, única do país onde atualmente se cultiva lúpulo, obtêm-se produtividades que frequentemente ultrapassam 2000 kg/ha. Mesmo em países como Alemanha e Estados Unidos, que são os maiores produtores mundiais de lúpulo da atualidade, a produtividade média Nacional está francamente abaixo da que é obtida Portugal (Figura 2).

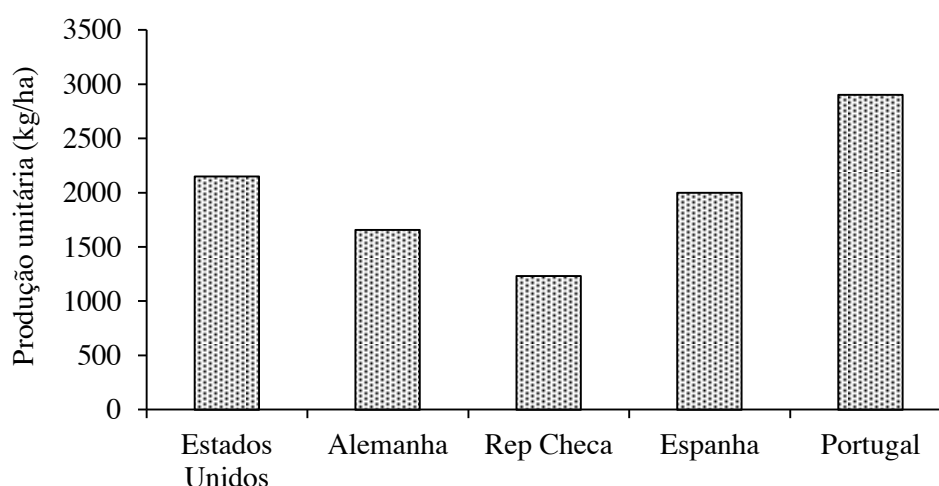


Figura 2. Produtividade em alguns dos maiores produtores mundiais de lúpulo, em Espanha e em Portugal (FAO, 2015).

Se for usada para comparação a cultura da cevada, que é uma planta cultivada genericamente no território Nacional e a principal matéria-prima usada no fabrico de cerveja se excluirmos a água, verifica-se que a sua performance quando cultivada no território Nacional é bem mais modesta. As produtividades médias nacionais estão habitualmente abaixo de 1500 kg de grão por hectare, enquanto em país como a Bélgica se podem ultrapassar 8000 kg/ha (FAO, 2015). Assim, apesar do lúpulo ser cultivado em Portugal apenas em duas explorações agrícolas num total de 12 ha, o potencial ecológico desta cultura em parte do território nacional é enorme.

Se existe potencial ecológico para produzir lúpulo por que razão a cultura foi abandonada quando em outros países se manteve com vitalidade? A resposta a esta questão pode não ser fácil, mas deve notar-se que a produtividade não é o único componente da rentabilidade da cultura. O valor de mercado ou o preço de venda do lúpulo é determinante e este foi ficando estagnado ao longo dos anos. Deve notar-se que os custos de produção dispararam ano após ano, devido ao aumento dos preços dos fatores de produção (energia, mão-de-obra, pesticidas, fertilizantes, ...). Contudo, esta conjuntura foi idêntica na maior parte dos países produtores, não sendo razão suficiente para em Portugal a cultura ter definhado enquanto em outros países progrediu. Acontece que a cultura em Portugal tem vulnerabilidades específicas. A preparação do extrato é feita na Alemanha, o que significa um encargo significativo associado ao transporte da flor. Em Portugal nunca se construiu uma fábrica de preparação de extrato. Considerou-se que para a rentabilizar seria necessária uma área de cultivo de 500 ha (Almeida, 1981), valor que nunca foi atingido. Por outro lado, Portugal mantém uma técnica cultura muito onerosa, com custos elevadíssimos associados à rega e suas implicações na restante técnica cultural. A necessidade de preparar o extrato na Alemanha e uma técnica cultural muito cara retiraram competitividade à cultura, reduzindo o rendimento das explorações e conduzindo ao abandono da atividade.

Potencial de expansão da cultura e constrangimentos

Em Portugal estão em produção apenas duas explorações, ambas na zona de Bragança, que cultivam um total de 12 ha.

No passado, a zona de Bragança atingiu valores máximos de área instalada de 99,5 ha em 1986. A zona de Braga registou o máximo histórico de área semeada de 118,5 ha em 1980. Contudo, o máximo histórico Nacional ocorreu em 1976, com 205,8 ha no

conjunto das duas regiões produtoras (Patrício, 1995). Se as áreas máximas de produção das duas zonas produtoras nacionais tivessem coincidindo no tempo, ter-se-iam registado 218 ha.

Deve também ter-se em conta que a cultura foi restringida às zonas de Braga e Bragança com base num decreto-lei de 1966 (Decreto-Lei 47011, de 16 de maio), tendo este decreto sido baseado em informação recolhida em ensaios de adaptação da cultura do lúpulo ao território Nacional. Contudo, tudo leva a crer que a restrição do cultivo provavelmente não necessitaria de ser tão exigente. Parece óbvio que muitas outras regiões do Norte e Centro do país têm possibilidades de cultivar lúpulo com relativo sucesso. Parece não haver dúvidas que na conjuntura certa e com a técnica cultural adequada Portugal poderia produzir lúpulo para satisfazer as necessidades da indústria cervejeira Nacional. Este otimismo encontra, contudo, obstáculos difíceis de transpor e que estão relacionados com os custos de instalação da cultura e com a diversidade de equipamentos específicos necessários. Para além da armação do campo e dos custos com plantas para a instalação, os produtores devem dispor, individualmente ou para utilização coletiva, de equipamento de poda, máquina de colheita das flores, forno de secagem, etc.. Assim, sem um programa de apoio específico para esta cultura, será utópico pensar-se em reativar um setor que já foi próspero em Portugal.

Estratégias para ultrapassar os problemas

O investimento inicial elevado com equipamentos e infraestruturas específicos reclama um programa de apoio específico à instalação e/ou reconversão desta cultura. Sem o referido programa os habituais candidatos a projetos de jovem agricultor dificilmente terão condições financeiras para se instalarem. Mesmo os antigos campos de produção, entretanto desativados, teriam grandes dificuldades em retomar a produção porque a armação do terreno e restantes equipamentos e infraestruturas não estão, no presente, operacionais. As infraestruturas e equipamentos de uso coletivo de que a Bralúpulo (Associação dos Produtores de Lúpulo de Bragança e Braga) dispunha já foram também irreversivelmente desativados.

O setor do lúpulo português tem, no presente, uma técnica cultural pouco eficiente. Os custos de produção são elevadíssimos e retiram competitividade ao setor. A rega parece ser o centro nevrálgico da cultura. Na técnica cultural tradicional o lúpulo é regado à manta, isto é, procede-se à inundação de todo o espaço da entrelinha. Esta técnica para

além de exigir um bom nivelamento dos campos tem um conjunto de implicações negativas em muitos outros aspetos da técnica cultural. Na cultura do lúpulo de futuro a rega deveria ser feita por gota-a-gota, em sistemas instalados à superfície ou enterrados.

A rega à manta tem elevados custos de mão-de-obra. Numa exploração de 6 ha, como as que estão atualmente em produção, a rega ocupa uma pessoa praticamente a tempo inteiro durante todo o verão. A rega à manta apresenta reduzida eficiência de uso da água e uma distribuição espacial da água no solo pouco uniforme. A elevada superfície de solo humedecida origina grandes perdas de água por evaporação. Por outro lado, com um nivelamento deficiente criam-se no campo de cultura zonas de elevada acumulação de água e zonas de rega insuficiente com consequências negativas na produtividade. A rega à manta provoca elevada compactação do solo e dificuldade de infiltração da água após terem sido efetuadas algumas regas sobre a mesma superfície. Os produtores regam habitualmente entrelinha sim entrelinha não para atrasar o processo de compactação do solo. Ao fim de duas regas em cada entrelinha passam o escarificador para destruir a crosta superficial e facilitar a infiltração de água. Contudo, estas mobilizações aceleram a mineralização da matéria orgânica, encarecem a técnica de cultivo e originam emissões de dióxido de carbono para a atmosfera (queima de gasóleo e oxidação da matéria orgânica do solo). A elevada evaporação que ocorre após as regas cria um microclima de maior humidade ao nível da canópia, que provavelmente dificulta o controlo de doenças e pragas. Na técnica cultural tradicional são efetuados 12 a 14 tratamentos fitossanitários (Almeida, 1981), com os custos económicos e ambientais associados. Tudo indica que campos instalados com sistema de rega gota-a-gota se tornariam muito mais eficientes com um enorme conjunto de vantagens de entre as quais se destaca a redução de custos.

A rega gota-a-gota reduziria os custos de mão-de-obra e os consumos de água e energia, resultantes do uso de menores quantidades de água. O solo poderia ser gerido com cobertos vegetais semeados, reduzindo-se ou eliminando-se as mobilizações e os custos associados, bem como os efeitos negativos na fertilidade do solo. Com rega gota-a-gota seria também possível reduzir a pressão sanitária nos campos de cultivo devido ao um microclima de menor humidade que seria criado. Seria ainda possível a fertirrigação, com fracionamento dos fertilizantes ao longo da estação de crescimento, o que também originaria maior eficiência de uso dos nutrientes e redução de impactes ambientais negativos.

A reestruturação da cultura necessita de ser acompanhada de um programa de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico (I&DT) que permita uma melhoria rápida

da performance do setor. No passado, a técnica cultural instalada foi importada de países em que a cultura tinha maior expressão, em particular de Espanha e da Alemanha. Agricultores e técnicos foram implementando a técnica cultural seguida nesses países. No presente, Portugal tem um sistema científico e tecnológico com capacidade para estudar e ajudar a implementar tecnologias de cultivo adaptadas às condições ecológicas locais, o que poderia tornar o setor mais competitivo.

O programa de I&DT deveria estar centrado na agronomia da cultura. Portugal necessita de um setor produtivo competitivo que gere riqueza nas zonas deprimidas de montanha onde poucas outras culturas têm possibilidade de gerar rendimento. É necessário enquadrar a rega num programa I&DT (são necessários cálculos de dotação de rega e intervalos de tempo entre regas face às condições locais e novos sistemas de rega). Não é aceitável um calendário de tratamentos onde se faça referência a 14 caldas por ano. As estratégias de proteção sanitária da cultura têm de ser reavaliadas pelos especialistas do sistema científico nacional. O lúpulo é uma planta de elevada exportação de nutrientes e com problemas de desordens nutricionais já anteriormente diagnosticados (Costa e Dias, 1981; Costa, 1982), pelo que a gestão da fertilidade do solo e da nutrição mineral das plantas é também uma área estratégica para o desenvolvimento da cultura. A poda e a sua relação com o estabelecimento da canópia e com a definição do número de plantas colocadas a trepar, adequadas às cultivares e condições ecológicas locais, deve também ser estudada. E, obviamente, toda a tecnologia pós-colheita, que permita fornecer às cervejeiras produto de elevada qualidade, deve merecer atenção no programa de I&DT. O programa deveria ser dotado de meios que permitissem a instalação de campos experimentais onde pudessem ser ensaiados variados aspetos da tecnologia de cultivo.

Referências

- Almeida, M.J. 1981. Introdução à cultura do lúpulo em Portugal. 1^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- Carrilho, F. 1981. Necessidades do lúpulo do ponto de vista do clima e trabalhos culturais. 1^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- Costa, A.S.V. 1982. Deficiências de magnésio e potássio na cultura do lúpulo. 2^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Costa, A.S.V., Dias, J.C.S. 1981. Notas sobre o estado de fertilidade dos solos de alguns campos de lúpulo do Minho e Trás-os-Montes. 1^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.
- FAO 2015. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália. Disponível em: <http://faostat3.fao.org> (consulta em julho de 2015).

- Navarro, J., Pereira, J., Carrilho, F., Bobone, A., Gil, J., Mendes, C. 1982. Considerações sobre a evolução da técnica cultural do lúpulo em Portugal. 2^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Patrício, M.G.R. 1995. A cultura do lúpulo em Portugal. Custos de reconversão varietal e análise financeira de um caso tipo. Trabalho de Fim de Curso, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- Rybáček, V. 1991. Hop Production. Elsevier, New York.
- Trigueiro, J.J.B., Vasconcelos, M.A. 1981. Fatores climáticos: a sua influência na cultura do lúpulo. 1^{as} Jornas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Braga.

Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. resistentes a vírus

M^a. João Sousa¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

A biotecnologia vegetal tornou-se uma ferramenta fundamental no melhoramento das mais variadas espécies. Na sua vertente de transformação genética, abriu novos horizontes de interesse agrícola e económico, no controlo de doenças e pragas. No lúpulo, a perda de produtividade, devido a infeções virais, levou a que a estratégia de transformação genética, para introdução de resistência a vírus, se tornasse extremamente interessante. Neste trabalho, procurou-se estabelecer condições para obter um sistema de transformação eficiente, com base na introdução do gene da cápside viral. Testou-se o sistema de micropropagação e de regeneração em duas cultivares (Eroica e Brewer's Gold) e num clone espontâneo (Bragança). Utilizaram-se diferentes meios base e diferentes explantes (folhas, pecíolos e entrenós). Este sistema de regeneração, permitiu desenvolver dois processos de transformação: 1) mediado por *Agrobacterium* e 2) bombardeamento de partículas. Foram testados diferentes parâmetros de transformação (plasmídeos, tempos de corte, co-cultura, meios de seleção). Verificou-se a transformação por diferentes técnicas de análise molecular e obteve-se transformação estável em qualquer dos processos. Após 2 anos em terra, as plantas transformadas utilizando os dois processos, foram testadas para o gene da *cpArMV*, apresentando resultados positivos.

Palavras-chave: cultura *in vitro*; *Humulus lupulus* L.; transformação genética; Cápside viral do Arabis mosaico vírus (*cpArMV*)

Introdução

O *Humulus lupulus* L. é uma espécie herbácea perene e dióica da família *Cannabaceae*, de grande valor económico na indústria cervejeira [1]. A sua distribuição espontânea ocorre em zonas temperadas, encontrando-se no hemisfério norte acima dos 32° de latitude até aos 55° [2]. A sua utilização na indústria cervejeira só começou no século XII, mas no século XV a sua utilização era universal e hoje o lúpulo produzido para este fim, é uma significativa fonte de rendimento em vários países [3]. Esta é uma

espécie sensível a um vasto conjunto de pragas e doenças (Nemátodos, insetos, fungos, bactérias, vírus e viróides), o que causa grandes reduções no conteúdo em α -ácidos, comprometendo a qualidade e conseqüente comercialização [4]. Os primeiros trabalhos de cultura *in vitro* de lúpulo são da década de 70 do séc. XX [5]. Atualmente a cultura *in vitro* é a ferramenta essencial para multiplicação (clonagem), manutenção de stocks, e melhoramento com a transformação genética. A obtenção de plantas após transformação genética é um dos possíveis objetivos da regeneração de plantas *in vitro*, e da sua propagação *in vitro*, permitindo o melhoramento da planta em várias vertentes como a produção e resistência a doenças. Neste trabalho desenvolveu-se um protocolo reprodutível para estabelecimento, propagação, regeneração e transformação de lúpulo.

Material e Métodos

Micropropagação e Organogénese

Material vegetal

O material vegetal utilizado nos diferentes ensaios foi obtido de plantas femininas de lúpulo de duas cultivares (var.) – Brewers Gold (BG) e Eróica (Er) – propagadas *in vitro*, e de um clone espontâneo da região de Bragança que se denominou Clone Br. A var. BG foi estabelecida em cultura a partir de explantes recolhidos de plantas existentes no Jardim Botânico de Lisboa. A var. Er foi micropropagada a partir de explantes obtidos de material cedido pela Bralupulo.

Condições de propagação

Na propagação das plantas utilizou-se meio de Adams [6] modificado (20 g/L de glucose e 0,75 mg/L de ácido indolbutinico (IBA) e 0,2 mg/L de benzil amino-purina (BA), que denominamos Adams 1.

Para micropropagação das plantas foram inoculados os meristemas axilares e apicais. Os meristemas foram colocados na vertical no meio de cultura (esterilizado por autoclavagem de 15 minutos a 120°C e 1 atm) e mantidos num fotoperíodo de 16/8h (luz/escurecimento) obtido com lâmpadas “day-light” 35 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A subcultura das plantas ocorreu a intervalos de 6 semanas

Indução de meristemas adventícios (organogénese)

Os meios testados foram os de Adams [6], MS [7] e SH [8]. Foram utilizados 10 mL de meio sólido em cada tubo de cultura (7 g/L de agar-agar). Como fonte de carbono utilizou-se a sacarose (15 g/L). As diferentes suplementações hormonais testadas encontram-se na Tabela 1. O anti-oxidante utilizado em todos os meios foi a Cisteína (15 mg/L). As condições de luz e fotoperíodo foram as utilizadas na micropropagação. Foram inoculados segmentos de entrenós (Fig. 1), e pecíolos de folhas.

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O processo de co-cultura iniciou-se pela preparação da suspensão de bactérias, obtida pela colocação em 20mL de meio LB (V-Reis, Lisboa), de uma colónia da estirpe LBA 4404, com o plasmídeo pROKArMV, isolada em meio sólido. Nos ensaios de transformação com pré-cultura, o material vegetal foi previamente cortado 26h ou 48h antes e colocado a incubar a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, em meio de regeneração. Na transformação propriamente dita, o material foi mergulhado numa solução de sacarose 0,3% e bactérias (OD=0,6), sendo a solução diluída para um valor final de 0,2. Nestes ensaios, utilizaram-se explantes provenientes de entrenós. Após a imersão, cuja duração variou entre 10 e 12 minutos, os entrenós foram secos em papel de filtro estéril e colocados em meio fresco de regeneração com antibióticos

Seleção do material após transformação

Após 48 a 72 horas de co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura idêntico ao utilizado durante a co-cultura, ao qual foi adicionado 250mg/L de carbenicilina(carb) e 250mg/L de cefotaxima (cef). Parte do material foi transferido para meio com 25mg/L de canamicina (can.), para além dos antibióticos de eliminação das bactérias. Três semanas depois, o material foi novamente transferido para meio de seleção suplementado com 50mg/L de can. Os meristemas regenerados foram transferidos para meio de micropropagação contendo antibióticos de seleção (50mg/L de can).

Transformação genética por bombardeamento de partículas

Após dois dias de pré-cultura, no escuro, os explantes foram transferidos para a luz (condições descritas anteriormente), e transformados por bombardeamento de partículas. Depois do bombardeamento as condições de cultura foram semelhantes às condições de co-cultura com *A. tumefaciens* (meio de regeneração contendo 25mg/L de can. como

antibiótico de seleção. Três semanas depois o material foi transferido para meio fresco de regeneração contendo 50mg/L de can.). Os entrenós de plantas, mantidas durante 2 meses em cultura, utilizados como explantes, foram seccionados e colocados em meio de indução 48h antes do bombardeamento.

O aparelho utilizado para os bombardeamentos foi o PDS-1000/ He delivery system (BioRad Laboratories, Hércules, U.S.A.). Um volume de 6 μ L da suspensão de partículas de ouro e DNA foi pipetado e colocado na superfície dos “macrocarriers”. Após secagem dos “macrocarriers” na bancada de fluxo laminar, estes foram colocados a 6mM do ecrã de paragem e as amostras foram colocadas a 6, 9 e 12cm. Os explantes foram bombardeados a 1300, 1500 e 2000 Psi (Tabela 2). Após a transformação, o material foi colocado em meio de regeneração com uma pressão seletiva de 25mg/L de can., sendo esta concentração aumentada para 50mg/L, na subcultura seguinte

Determinação da expressão transiente

A atividade da β -glucuronidase foi detetada no material vegetal transformado por bombardeamento, ou *A. tumefaciens* recorrendo ao método histoquímico descrito por Jefferson [9].

Análise molecular das plantas

Extração de DNA das plantas

Folhas e meristemas apicais de plântulas jovens foram utilizados para a extração de DNA. Para a análise do DNA por PCR o processo foi feito 1Mês após a transformação. A extração de DNA foi efetuada de acordo com o protocolo descrito no anexo 2 adaptado a partir de Yang e King e modificado de Doyle e Doyle [10].

Análise do DNA por PCR

O DNA genómico das plantas foi usado para a amplificação por polimerase em cadeia dos genes presentes nos plasmídeos. Foram amplificados os genes *uid A* e o *npt II*, seguida da determinação do gene de interesse, codificante da proteína da cápside viral do ArMV. análise por PCR para o gene *npt II* foi feita com os seguintes “primers”: 5’-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTGG-3’ e o 5’-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTAA-3’. O programa utilizado foi o seguinte: 95°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94°C, 1 Minuto; 65°C, 1 Minuto; 72°C, 1 Minuto; 30 ciclos, no final um passo de elongação de 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. A análise

para o gene *uid A* foi feita com os “primers”: 5’-CCC GGC AAT AAC ATA CGG CGT-3’ e 5’-CCT GTA GAA ACC CCA ACC CGT-3’ e usado o seguinte programa: 94°C, 5 minutos para a abertura inicial das cadeias; 94 °C, 1Minuto, 60°C, 1Minuto; 72°C, 3 minutos; 30 ciclos e final o passo 10 minutos a 72°C para terminar as cadeias ainda incompletas. A visualização dos produtos de PCR foi feita por electroforese em géis de agarose (1,2%) em solução tampão TAE (40mM Tris, pH 7,8, 2mM EDTA) com Brometo de Etídio a 0,3 µg/mL. A determinação da concentração do DNA, foi feita por espectrofotometria de absorção molecular, a 260nm. O peso molecular foi determinado por comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

Resultados e Discussão

O meio utilizado na micropropagação foi o meio Adams modificado (15 g/L glucose com 0,75 mg/L IBA e 0,2 mg/L BA), para todas as cultivares, com crescimento igualmente rápido, nas diferentes cultivares e clone. Foi determinado qual o melhor meio e melhor explante, para a obtenção de organogénese. Foram testados vários meios base e várias combinações de fitorreguladores. Verificou-se que, para cada variedade, o meio com maior taxa de regeneração foi diferente. Assim, para a variedade BG o melhor meio foi o meio MS suplementado com 3 mg/L Zea e 0,025 mg/L de IAA, enquanto, para a variedade Er o meio testado, com taxa de regeneração mais elevada, foi o meio SH suplementado com 1,5 mg/L Zea e 0,025 mg/L IAA. Para o Clone Br, o meio selecionado para os ensaios posteriores de regeneração, foi o meio MS com 15 g/L de sacarose e 1,5 mg/L de Cinetina e 0,02 mg/L de IAA.

Na tabela 1 apresentam-se os meios testados para organogénese (ou regeneração de meristemas) com os resultados obtidos em cada meio e em cada cultivar estudada.

Transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

Os resultados obtidos na transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, apontam para uma frequência de regeneração, após transformação, mais baixa que a obtida, quer no controlo, quer quando foi utilizado o bombardeamento de partículas. A frequência de regeneração utilizando o *Agrobacterium tumefaciens* é ligeiramente inferior (cerca de 6%), à das plantas controlo (Fig. 2). Enquanto a frequência de regeneração dos explantes transformados por bombardeamento de partículas foi de 23%, 3% inferior aos valores atingidos nas plantas controlo. As plantas obtidas foram selecionadas para análise por PCR, para determinação da presença do gene *uid A*. Em 2%

do total de plantas obtidas, a pressão seletiva da can. só foi visível ao fim de duas passagens por meio com antibiótico (aproximadamente 4 meses). Só após 4 meses em meio de seleção (meio com antibiótico) com 50 mg/L de can., foi possível observar na planta sintomas de sensibilidade ao antibiótico: perda de clorofila e início de necrose que, acaba por levar à morte da planta, pelo que se optou por analisar as plantas por PCR, após 4 meses de cultura em meio seletivo (Fig. 3).

Se for utilizada uma quantidade de canamicina superior logo na fase inicial de regeneração, o material acaba por não regenerar, possivelmente por inibição das células envolventes que não resistem e morrem. Se a can for colocada no meio mais tarde, após a transformação (ex: 25 dias), a concentração de can. suportada, é mais elevada (50mg/L). Nesta fase, as células transformadas já se multiplicaram e iniciaram a regeneração dos meristemas, o que permite uma maior resistência à inibição provocada pela eventual morte das células circundantes não transformadas. No entanto, a aplicação de pressão selectiva aos transformantes, mais tarde no processo de regeneração, poderá dar origem a um maior número de quimeras. A possibilidade de aparecerem células que regeneram sem estarem transformadas, num meio de selecção, poderá estar relacionada com a inactivação da can. pelas células circundantes transformadas, durante o desenvolvimento meristemático [11]

Transformação genética por bombardeamento de partículas

Os resultados para os diferentes ensaios de pressão e distância mostraram que, para este material (entrenós), a pressão em que foram obtidos resultados significativos foi a de 1500 psi à distância de 9 e 6cm, e 2000 psi à distância de 6cm (Tabela 3). O facto de haver uma expressão da proteína somente em algumas das plantas transformadas, não implica necessariamente que não exista uma possível resistência à infeção viral, uma vez que a resistência pode ser determinada ao nível da transcrição e presença do RNA da cápside [12]. A expressão da cápside viral em plantas transformadas por bombardeamento de partículas é inferior à expressão obtida para as plantas transformadas com *Agrobacterium tumefaciens*, o que pode estar associado aos locais de inserção e aos processos de silenciamento [13]. No caso das transformações por bombardeamento de partículas a integração será menos direccionada, o que poderá dar origem a maior numero de escapes, que não apresentariam qualquer expressão, quer do RNA, quer da proteína.

Análise molecular das plantas

Foram obtidas plantas putativamente transformadas de *Humulus lupulus*, quer após transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, quer após bombardeamento de partículas. A presença dos genes foi confirmada, por PCR, 2 meses após a transformação (tempo correspondente a uma subcultura). Findo este período, as plantas analisadas deixavam, com frequência, de apresentar, no gel dos produtos de PCR, a banda correspondente aos genes introduzidos. A regeneração e o desenvolvimento das plantas transformadas não foram alterados após a transformação. Parte das plantas analisadas foram posteriormente transferidas para vaso, sendo esta aclimação um processo em tudo semelhante ao efetuado para as plantas regeneradas, com uma percentagem de sucesso equivalente. Nos testes feitos a plantas transformadas com o gene da *cpArMV* obtiveram-se resultados semelhantes. Verificou-se que, tal como anteriormente, nem todas as plantas expressavam os dois genes da construção (*cpArMV* e *nptII*) de igual modo. As plantas em que o gene permaneceu integrado nos respetivos genomas, e foram transferidas para terra, foram analisadas por várias técnicas de análise molecular para além de PCR (Southern blotting, Northern blotting a expressão do gene da cápside viral foi testada por DAS-ELISA) (dados não apresentados), sendo os resultados dessas análises sido positivas num número reduzido. O gene *cpArMV* foi integrado nas plantas que sofreram transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, e nas que foram transformadas por bombardeamento de partículas. A percentagem de plantas que mantiveram o gene integrado ao fim de 6 meses, contudo, foi bastante baixo, não ultrapassando os 2 a 5%. Este resultado mostra que, ainda que num número reduzido de plantas, foi possível a incorporação estável do transgene. Outros trabalhos utilizando a transformação mediada pela estirpe de bactérias LBA 4404 de *A. tumefaciens*, e a construção 35SGUSINT, revelaram-se pouco conclusivos quanto à integração estável de genes no lúpulo [14]; [15]. O facto de haver uma expressão da proteína somente em algumas das plantas transformadas, não implica necessariamente que não exista uma possível resistência à infeção viral, uma vez que a resistência pode ser determinada ao nível da transcrição e presença do RNA da cápside [12]. Com o ensaio de Análise da manutenção do gene nas plantas transferidas para o campo foi possível verificar que, apesar de as plantas se encontrarem há mais de 2 anos em terra, o que significa que não estão sujeitas as pressões de meios de seleção, a expressão do transgene manteve-se (Fig.3). Estas plantas, sem pressão seletiva, permitem-nos considerar que o gene se mantém de facto estável,

permitindo um bom ponto de partida para estudos futuros de resistência a inoculações virais. A obtenção, ainda que de uma única planta transformada, permite que, utilizando métodos de micropropagação, se consiga um grande número de plantas com uma transformação estável e com boas possibilidades de serem resistentes ao ArMV.

Figuras e Quadros

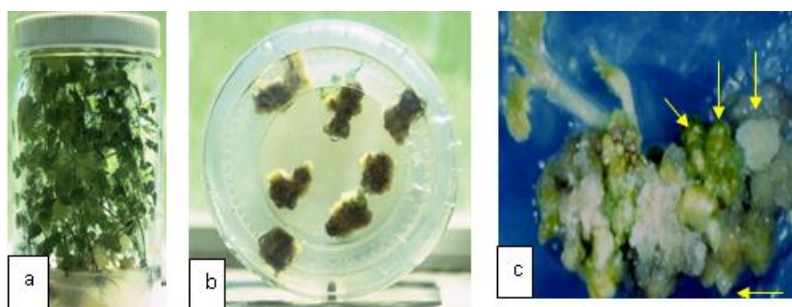


Figura 1: Do material já *in vitro* das diferentes cultivares e clone Bragança (a), foram retirados os pecíolos e entrenós e colocados em meios de indução de organogênese (regeneração de meristemas) (b), após a formação de algumas estruturas indiferenciadas (*calli*) surgem os meristemas a partir dos quais se desenvolvem novas plantas (c)

Tabela 1. Meios utilizados para a regeneração de meristemas e resultados obtidos para cada meio e cultivar.

Meio de Indução	Meio base	Zeatina (mg/L)	IAA (mg/L)	Cinetina (mg/L)	% Regeneração (Bragança-Br)	% Regeneração (Eroica-Er)	% Regeneração (Brewers Gold-BG)
I1	MS	2,5	0.025		30	5,4	3,2
I2	MS	3	0.025		28	3	10,5
I3	MS		0.02	1.5	60	2,3	5,8
I4	MS	5	0.025		1,5	1,4	1,8
I5	MS	2	0.01		21	13	5,5
I6	MS		0.01	2	2,4	2	1,7
I7	MS		0.025	3	37	5,1	4
I8	MS	1,5	0.025		40	3,2	6,3
I6.1	SH	1,5	0.025		1,6	30	3,7
I7.1	SH		0.03	1.5	1,9	18	2,7

Tabela 2. Distâncias e pressões testadas nos explantes submetidos a transformação por bombardeamento de partículas

Pressão (psi)	Distância (cm)		
1300	6	9	12
1500	6	9	12
2000	6	9	12

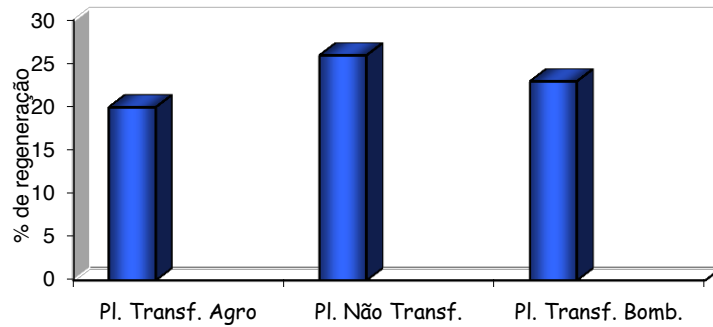


Figura 2. Percentagem de regeneração após transformação. Pl. Transf. Agro. – Plantas resultantes de transformação mediada por *Agrobacterium*; Pl Não Transf. – Plantas controle, não transformadas; Pl. Transf. Bomb. – Plantas resultantes de transformação utilizando como método o bombardeamento de partículas.



Figura 3. a) Planta em meio de seleção com 50mg/L de can. após 4 meses de cultura. b) Explantes em caixas de Petri, com meios de seleção, no primeiro mês após transformação (setas - rebentos). c) Várias plantas transformadas, em tubo com meio de seleção, após 4 meses. As plantas são todas da mesma idade e duas delas apresentam clorose por sensibilidade ao antibiótico (setas).

Tabela 3. Expressão transiente em entrenós de lúpulo bombardeados com p35SGUSINT. Os resultados estão expressos em explantes com manchas azuis. Os dados foram testados com o programa ACTUS. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$. Entre parêntesis encontra-se a percentagem de frequência das manchas azuis nos explantes.

Pressão (psi)	Distância (cm)		
	6	9	12
1300	255 (56,3%)	208 (41,5%)	370 (73,8%)
1500	394** (98,5%)	295** (43,8%)	370 (64,8%)
2000	175** (43,8%)	323 (80,8%)	179 (44,8%)

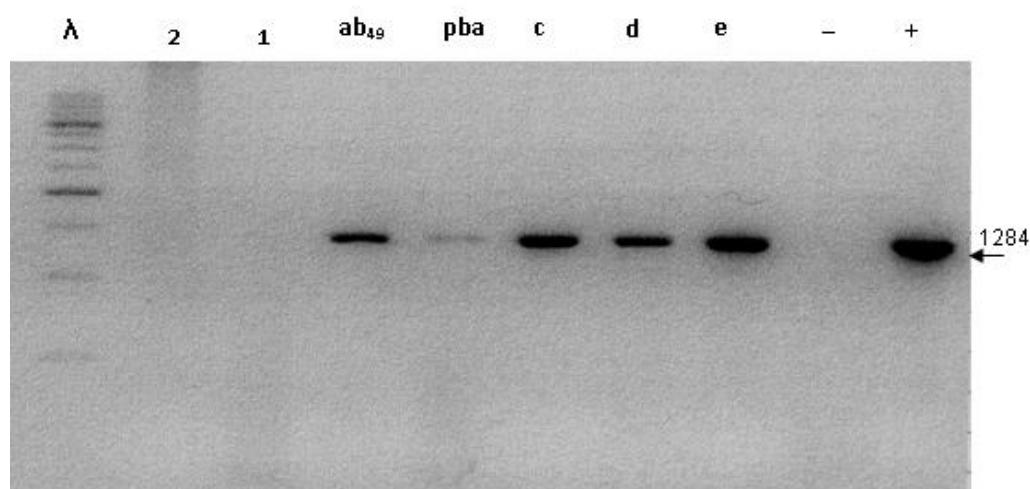


Figura 3. Produtos de PCR do gene da cápside viral do ArMV. As plantas ab_{49} , pba_1 e 2 foram plantas transformadas por bombardeamento de partículas. As plantas c, d, e, sofreram transformação mediada por *Agrobacterium*. A planta 1 é uma planta controlo não transformada. Controlo positivo (+) fragmento do gene do plasmídeo isolado por PCR. Controlo negativo (-) mistura de reação sem DNA. λ (marcador molecular XIV).

Referências

- [1] Heale J. B., Legg T., Connell S. (1989). *Humulus lupulus* L. (Hop): In vitro culture; Attempted production of bittering components and novel disease resistance. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.7, Medicinal and Aromatic Plants II, ed.by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [2] BH (2001). Beer & Health Dossiers – Hop Properties of the hop plant. www.bierengezondheid.be
- [3] Hiller Susan, Gingrich Gale A, Haunold Alfred (1996) Growing Hops - In the Home Garden. vol 19, nº5.
- [4] Benitez J.L., Magadan J.A. (1996). Aproximacion a la determinación del momento optimo de madurez del lúpulo. *Cerveza y Malta*, XXXIII (2), 130, 19:21.

- [5] Benitez J.L., Forster A., De Keukeleire D., Moir M., Sharpe F.R., Verhagen C.L., Westwood K.T. (2001). Hops and Hop Products, European Brewery Convention, Manual of Good Practice. Prepared for EBC Technology & Engineering Forum with the assistance of EU under the AIR programme. Produced at BRF International. pp 19:22
- [6] Adams, A. N. (1975). Elimination of viruses from hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. J. Hort. Sci., 50, 151:160.
- [7] Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473:497
- [8] Kubo S., Kagami Y., Nonaka K. (1975). Culture of stem tip of the hop and elimination of virus symptoms. Rep Res Lab Kirin Brewing, 18, 55:62
- [9] Jefferson R.A, (1987) Assaying chimeric genes in plants: the Gus fusion system. Plant Mol Biol Rep 5, 387:405..
- [10] Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11:15.
- [11] Maximova S., Dandekar A., Guiltinan M. (1998). Investigation of *Agrobacterium* – mediated ttransformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Mol Biol 37, 549:559.
- [12] Guo Shan H., Cervera Maria T., Garcia Juan A. (1998). Plum Pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. Gene, 206, 263:272.
- [13] Mlynárová L., Keizer C., Stiekema J., Nap J. (1996). Approaching the lower limits of transgene variability. The Plant Cell, 8, 1589:1599
- [14] Horlemann C., Schwekendiek A., Höhnle M., Weber G. (2003). Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 22, 210:217
- [15] Oriniakova P., Pavingerova D., Matousek J. (1999). Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. ROSTLINNA VYROBA, 45: (5) 219-227

Macrozonagem da Aptidão do Solo para a Cultura do Lúpulo no Distrito de Bragança

João Paulo Castro¹, Jorge Sá Morais², M Ângelo Rodrigues¹

¹Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança

²Unidade de Química Analítica – Instituto Politécnico de Bragança

Resumo

Existem em Portugal excelentes condições para o lúpulo, cuja cultura já teve uma dimensão importante nas regiões de Bragança e Braga. À presente data restam apenas cerca de 12 hectares pertencentes a 2 produtores de Bragança. O abandono desta cultura acompanhou o gradual abandono doutros sistemas tradicionais de agricultura, como os terrenos de regadio e pastagens permanentes. No contexto actual, podem existir possibilidades favoráveis para o regresso da cultura do lúpulo.

Neste trabalho fez-se inicialmente uma revisão sobre os aspectos culturais do lúpulo e da sua adaptação ecológica. Foram consideradas as possibilidades de modernização desta cultura – instalação, fertilização, poda, rega, protecção sanitária e colheita, que permitam considerar o alargamento para outras áreas potenciais além das outrora ocupadas com lúpulo.

Considerando as exigências edafoclimáticas desta cultura modelou-se a informação geográfica digital disponível através de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e pesquisaram-se as áreas de Bragança potencialmente mais favoráveis para a instalação do lúpulo. O conhecimento que venha a adquirir-se futuramente acerca da cultura do lúpulo na região poderá refinar esta análise.

Foi produzida uma simulação da aptidão de uso do solo para a cultura do lúpulo.

Palavras-chave: aptidão ecológica; *Humulus lupulus*; técnica cultural; SIG; Macrozonagem; modelação geográfica.

Introdução

Em Portugal, o lúpulo ocorre espontaneamente em locais frescos e húmidos. A sua cultura intensiva requer elevadas quantidades de água de rega, até 7 vezes superiores às das condições da Alemanha (maior produtor mundial). O sistema de rega que é utilizado designa-se por “rega à manta” tratando-se de um sistema tradicional por alagamento e que implica a escolha dum local quase plano ou o seu nivelamento artificial. A instalação dum

campo de lúpulo envolve por isso o nivelamento do terreno com recurso a niveladoras, limitando desde logo as áreas potencialmente interessantes para locais planos onde exista água com abundância. A cultura do lúpulo em Portugal iniciou-se em 1962 em Bragança (Carmona, 1982), tendo sido trazidas de Espanha as primeiras plantas. Na Alemanha o lúpulo assume uma dimensão muito maior, havendo registos da sua cultura desde o século IX (Rybacek, 1991).

Sendo possível alterar alguns dos processos tradicionais, essencialmente na rega, as áreas potenciais podem aumentar. Constatou-se que na Alemanha, embora a extensão desta cultura seja muito maior, a dimensão de cada parcela é quase sempre inferior a 1 ha. A dimensão média da exploração por proprietário é no entanto maior na Alemanha (cerca de 17 ha enquanto em Portugal é cerca de 6 ha). No domínio dos sistemas de rega, foi adoptado o sistema de rega “gota-a-gota” (Figura 1 à esquerda) com condutas suspensas. Este tipo de sistema de rega permite dispensar a remoção do sistema durante o inverno porque não prejudica as actividades culturais incluindo a colheita. Além disso permite a instalação da cultura em terrenos ligeiramente inclinados e ondulados ao contrário do actual sistema praticado em Portugal que carece de um bom nivelamento do solo.

Constatámos que actualmente na Alemanha não se realizam mobilizações do solo sendo promovidos os cobertos vegetais permanentes (Figura 1 à direita).

Não obstante as diferenças registadas, o sistema cultural português não difere significativamente do alemão. Poderemos dizer que em boa verdade os agricultores portugueses estão tecnologicamente evoluídos e ávidos de inovação. Esse aspecto é excelente porque pode motivar novos interessados num sentido correcto.

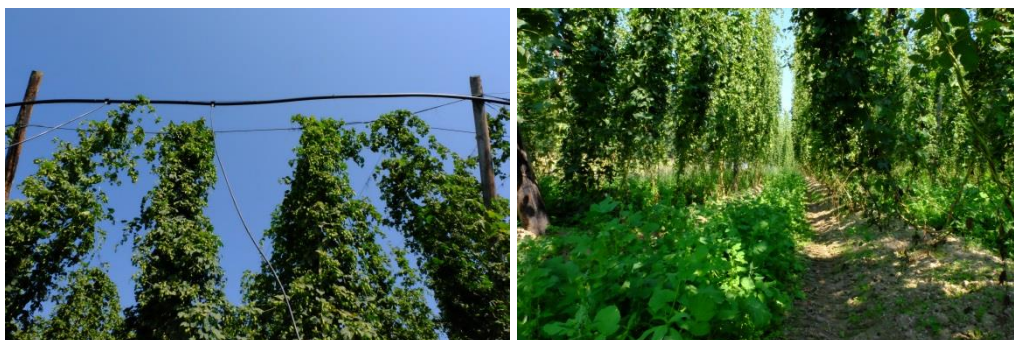


Figura 1. Sistema de rega gota-a-gota em lúpulo (esquerda); cobertura verde do solo (direita). (Alemanha, Agosto de 2015, fotos João Paulo Castro)

A região de Bragança apresenta especificidades climáticas em consequência do relevo. Poderemos dizer que existem duas principais regiões climáticas, as designadas “Terra Fria Transmontana” e “Terra Quente Transmontana”, a primeira com melhores

condições para a cultura do lúpulo, a segunda provavelmente não tanto. Entre ambas as regiões existem as regiões de transição.

Foram objectivos deste trabalho evidenciar as regiões mais propícias à cultura do lúpulo sobre as regiões de Terra Fria do distrito de Bragança (macrozonagem), pressupondo-se um posterior refinamento local com informação a recolher especificamente para o efeito (microzonagem).

Utilizaram-se Sistemas de Informação Geográfica (SIG) na modelação geográfica da informação disponível da região de Bragança para obtenção dum mapa de aptidão para a cultura do lúpulo na região de Bragança.

Modelação geográfica

A modelação geográfica é uma análise conjunta de restrições e de factores. Os factores são critérios que aumentam ou diminuem a adequação de uma alternativa específica para a actividade em questão e, por conseguinte, mais vulgarmente medidos numa escala contínua. O processo pelo qual os critérios são seleccionados e combinados para se chegar a uma avaliação em particular, e pelo qual as avaliações são comparadas e postas em prática, é conhecido como uma tomada de decisão (Eastman *et al.*, 1995; Eastman, 2009). Regras de decisão normalmente contêm procedimentos para combinar critérios num único índice composto e especificações de como as alternativas devem ser comparadas com este índice. Com uma combinação linear ponderada, são combinados factores (X_i) através da aplicação de um peso para cada um (p_i), seguido da soma dos resultados e, finalmente pela multiplicação pelo produto dos constrangimentos (C_j) obtendo-se um mapa de aptidão (A) (Eastman, 2005), isto é:

$$A = \left(\sum p_i \cdot X_i \right) \times \prod C_j$$

Procura-se reduzir a subjectividade dos critérios de decisão e compreender as suas implicações porque não podem ser todos maximizados na selecção de uma alternativa (Belton and Stewart, 2002). Por causa das diferentes escalas em que são medidos os critérios, os factores são padronizados:

$$X_i = (x_i - \min_i) / (\max_i - \min_i)$$

Quaisquer métodos de ponderação implicam: 1) **ordenação** (*ranking*) de critérios; 2) **Classificação** (*rating*) dos critérios numa escala comum; 3) **análise trade-off** (análises de conflitos de escolha); 4) **processo de hierarquia analítica**: calcula pesos relativos

globais com base em cálculos globais de todas as relações de pares (Eastman, 2009; Saaty, 1980; Saaty, 2008; Schmoltdt *et al.*, 2001).

O sucesso numa modelação geográfica depende sobretudo da qualidade da informação geográfica disponível.

Informação disponível e Pressupostos

O material de base consistiu em informação pública e ainda alguma informação geográfica produzida pelo IPB: a) **Carta dos Solos**, Carta do Uso Actual da Terra e Carta da Aptidão da Terra do Nordeste de Portugal, produzida pela Agroconsultores e Coba (1991), sob coordenação da UTAD (Armindo Aires Afonso Martins e José Martinho Lourenço). Foi transformada numa base de dados geográfica por Jorge Arsénio e João Paulo Castro (IPB); b) **Carta de ocupação do solo** (COS2007) recentemente disponibilizada pela Direcção-Geral do Território; c) **Hidrografia** do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos; d) **Modelo digital do terreno** do distrito de Bragança.

Pressupostos: a) **Localização** – Terra Fria do distrito de Bragança; b) Disponibilidade de água – abundante; c) **Fisiografia** do terreno – pouco ondulado e de suave declive; d) **Classes de ocupação do solo** actual – locais potenciais actualmente com pastagens permanentes, agricultura de regadio e de sequeiro convertível para regadio; e) **Acessibilidade** – locais com acesso rodoviário; f) **Distância a Bragança**; g) **Área homogénea** por parcela – parcelas com superfície mínima de 0.25ha; h) **Geometria** da parcela – parcelas quadradas ou rectangulares; i) **Área de exploração** – agrupamento de 6ha.

Para a microzonagem será necessário consultar as listagens de parcelas de terreno registado no Sistema de Identificação Parcelar Online (iSIP), uma iniciativa da Agência para a Modernização Administrativa de Portugal. Pretendem-se garantir áreas homogéneas por parcela – parcelas com superfície mínima de 0.25ha, Quanto à geometria da parcela, dos agrupamentos geográficos encontrados, serão preferíveis unidades que possam tomar formas quadradas ou rectangulares, evitando-se unidades geográficas cujas irregularidades de forma possam comprometer este tipo de cultura de alinhamento em sebe.

Por informação pessoal (BRALÚPULO, 2015), uma exploração de lúpulo consegue otimizar o equipamento necessário para a colheita e granjeios com uma área total de

6ha. Assim sendo, os agregados de unidades geográficas encontradas por modelação geográfica devem ser agora alocados a um explorador para se estabelecer um limiar de distância entre parcelas que não inviabilize as deslocações e que garanta disponibilidade de água.

A acessibilidade rodoviária facilita o transporte de maquinaria para granjeios e colheita. A centralização tecnológica no processamento e pré-processamento da flor do lúpulo carece de uma boa acessibilidade rodoviária.

Produziram-se mapas raster com resolução espacial de 900 m² (30m × 30m) para cada um dos temas requeridos na modelação geográfica. O valor dos atributos obedece a uma ordem decrescente de adequabilidade (1 – mais adequado; 4 – menos adequado; 0 – não adequado; <null> - dados fora da zona).

Localização – Terra Fria do distrito de Bragança

A Terra Fria, a Terra Quente e a Terra de Transição, são nomes que se dão a territórios situados no Nordeste Transmontano, cada um dos quais com particularidades importantes ao nível do clima, altitude, etc., e que criam condições específicas para certas culturas. A cultura do Lúpulo só é feita na Terra Fria.

Cada polígono da Carta de Solos representa uma Unidade cartográfica homogénea sob vários pontos de vista um dos quais a zonagem climática. Através de filtração geográfica isolámos as regiões de Terra Fria (Figura 2).

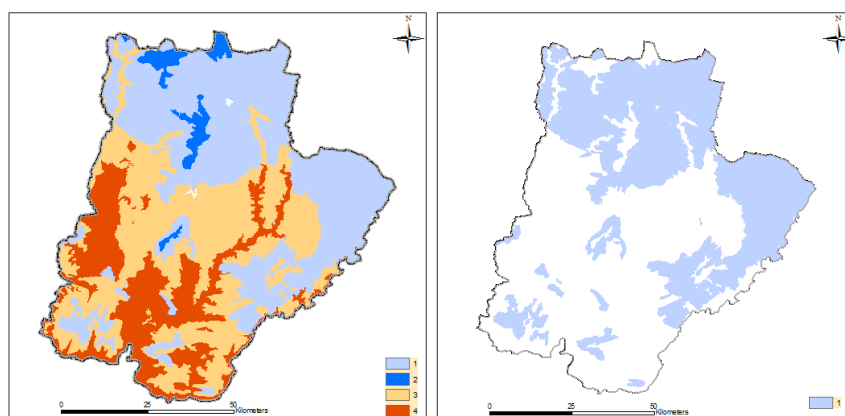


Figura 2. Zonagem climática do distrito de Bragança (esquerda) (GRID: 1 – Terra fria de Planalto; 2 – Terra Fria de Montanha; 3 - Terra de Transição; 4 – Terra Quente) e Terra Fria (direita: raster TerraFria)

Disponibilidade hídrica ao longo do ano (h)

A cultura do lúpulo é muito exigente na disponibilidade hídrica. Quanto mais curto o período de carência hídrica menor necessidade de água de rega.

Em função principalmente da precipitação média anual, da espessura útil do solo, da granulometria e da forma e declive do terreno, a carta de solos considera quatro graus de disponibilidade hídrica ao longo do ano (h) (Figura 3):

1. Com 2 meses ou menos de carência hídrica (**mais adequado**)
2. Com 2 a 4 meses de carência hídrica (**menos adequado**)
3. Com 4 a 8 meses de carência hídrica (**não adequado**)
4. Com > 8 meses de carência hídrica (**não adequado**)

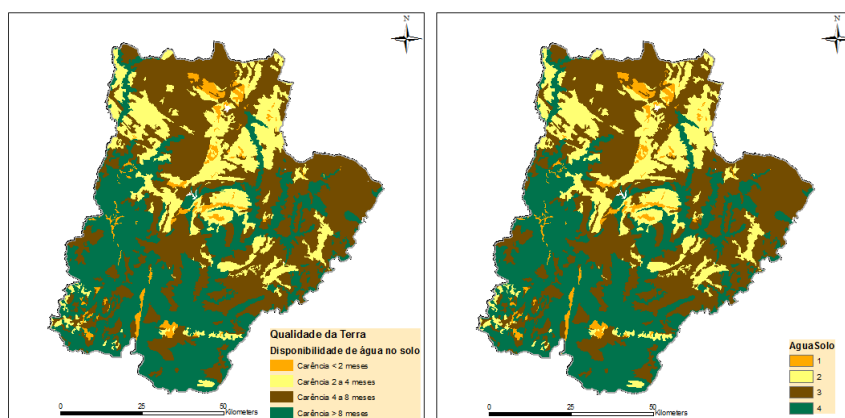


Figura 3. Disponibilidade hídrica ao longo do ano (h), (esquerda: polígonos) (direita: raster AguaSolo)

Afloramentos rochosos

Sendo o lúpulo uma cultura de alinhamento, rejeitam-se as parcelas de terreno com obstáculos – afloramentos rochosos, só sendo viáveis as parcelas sem afloramentos ou afectando menos de 25 % da área (Figura 4):

1. Sem afloramentos ou em área < 10% (**mais adequado**)
2. Com afloramentos em área 10-25% (**menos adequado**)
3. Com afloramentos em área 25-50% (**não adequado**)
4. Com afloramentos em área > 50% (**não adequado**)

Disponibilidade de água

A quantificação da disponibilidade de água é muito difícil e subjectiva. O agricultor deverá ponderar a prospecção de água antecipadamente e só *a posteriori* realizar um

investimento. Existem muitos casos em que a prospecção de água tem mais sucesso em zonas de planalto do que em zonas próximas de linhas água. No entanto, e considerando que a captação de água dos cursos de água é uma solução frequente para culturas de regadio como a do lúpulo, para efeitos de modelação de informação geográfica consideram-se como mais adequados os terrenos mais próximos de cursos de água (Figura 5).

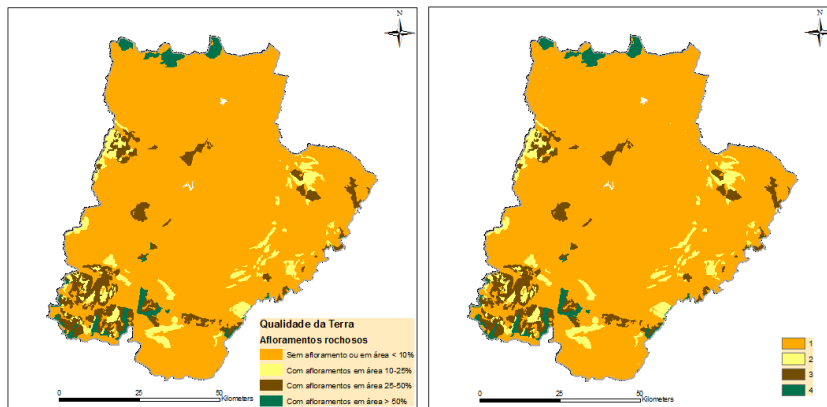


Figura 4. Classes de afloramentos rochosos, (esquerda: polígonos) (direita: raster AflorRochosos)

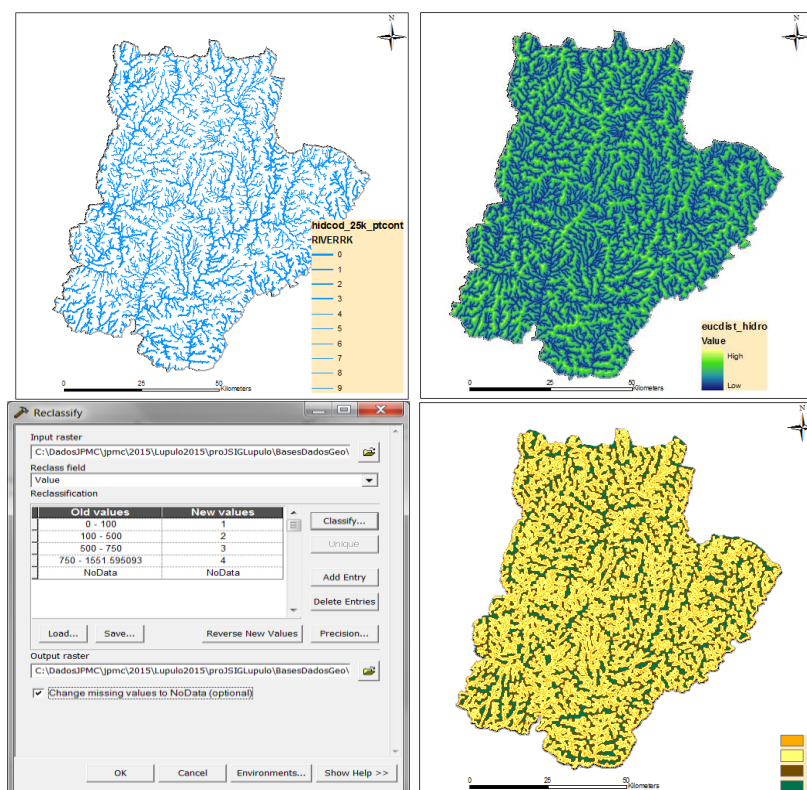


Figura 5. Águas superficiais do distrito de Bragança (à esquerda em cima) e distância euclidiana a cursos de água (à direita em cima); Reclassificação da imagem em 4 classes (1: 0 a 100; 2: 100 a 500; 3: 500 a 750; 4: maior que 750) (em baixo)

Distância a Bragança

A questão da distância a Bragança é um factor muito importante porque deverá ponderar-se alguma centralização tecnológica no processamento do produto. Determinou-se a distância em linha recta (distância euclidiana) da zona industrial de Bragança a todos os pontos do distrito (Figura 6).

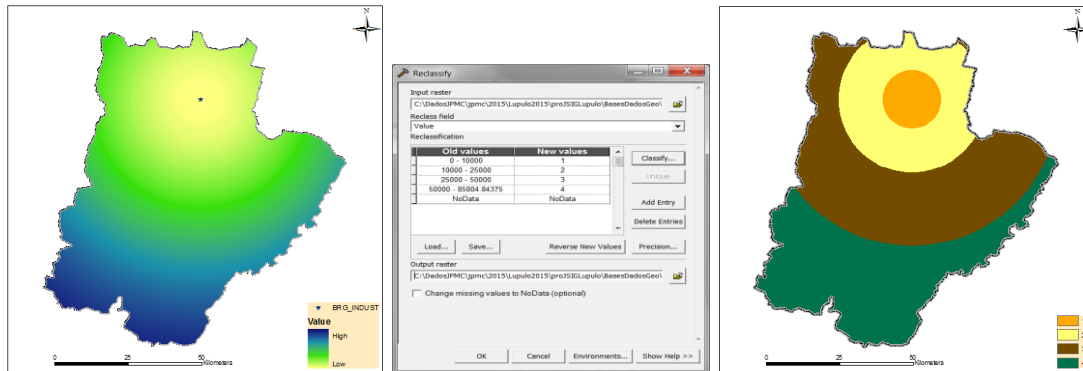


Figura 6. Reclassificação da distância euclidiana a Bragança

Fisiografia do terreno

O lúpulo é uma cultura de alinhamento carecendo de declives suaves e reduzida ondulação. Há no entanto uma maior flexibilização com a introdução de sistemas de rega gota-a-gota, em comparação com os sistemas tradicionais de rega por alagamento.

Para modelação da informação geográfica considera-se que a taxa de alteração de elevação não deverá ultrapassar um determinado limite cujo limiar será objecto de estudo. Assume-se que o declive do terreno não deverá ultrapassar 15%. O terreno foi agregado em 4 classes de declive (Figura 7):

1. Declive entre 0 e 5% (**mais adequado**)
2. Declive entre 5 e 10% (**bastante adequado**)
3. Declive entre 10 e 15% (**menos adequado**)
4. Declive superior 15% (**não adequado**)

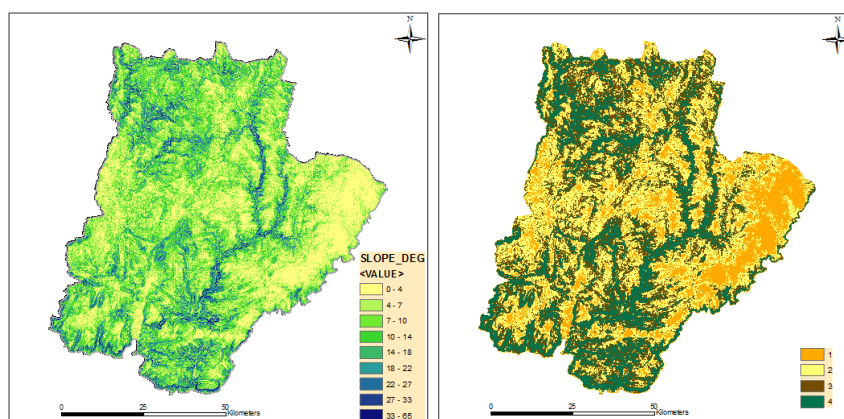


Figura 7. Declives (esquerda) e classes de declive (direita)

Classes de ocupação do solo actual

Uma das ferramentas mais importantes para modelação da informação geográfica no sentido de se encontrarem as parcelas de terreno mais propício à cultura do lúpulo é a carta de ocupação do solo (COS2007) recentemente disponibilizada pela Direcção-Geral do Território (DGT, 2015).

Os solos mais adequados à cultura do lúpulo são solos profundos, sem pedregosidade, sem afloramentos rochosos, de aluvião, normalmente dedicados à horticultura e pastagens permanentes. No entanto, havendo disponibilidade de água, as opções disponíveis aumentam.

Identificámos como interessantes para esta cultura do lúpulo as seguintes classes de ocupação de solo (Figura 8):

1. Pastagens permanentes (classe “2.3.1.01”), Pastagens associadas a culturas permanentes (classe “2.4.1.03”), Culturas temporárias de regadio (classe “2.1.2.01”), Culturas temporárias de regadio associadas a culturas permanentes (classe “2.4.1.02”), Sistemas culturais e parcelares complexos (classe “2.4.2.01”), Sistemas agro-florestais (SAF) com culturas temporárias de regadio (classe “2.4.4.02”) – **(mais adequado)**
2. Agricultura com espaços naturais e semi-naturais (classe “2.4.3.01”), SAF com pastagens (classe “2.4.4.03”), Vegetação herbácea natural (classe “3.2.1.01”), Pomares (Classe “2.2.2.01”), Pomares com vinha (Classe “2.2.2.02”), Pomares com olival (Classe “2.2.2.03”), Vinhas (Classe “2.2.1.01”), Vinhas com pomar (Classe “2.2.1.02”), Vinhas com olival (Classe “2.2.1.03”) – **(bastante adequado)**

3. Culturas temporárias de sequeiro (classe “2.1.1.01”), Matos pouco densos (classe “3.2.2.02”) – **(menos adequado)**
4. Outras classes – **(não adequado)**

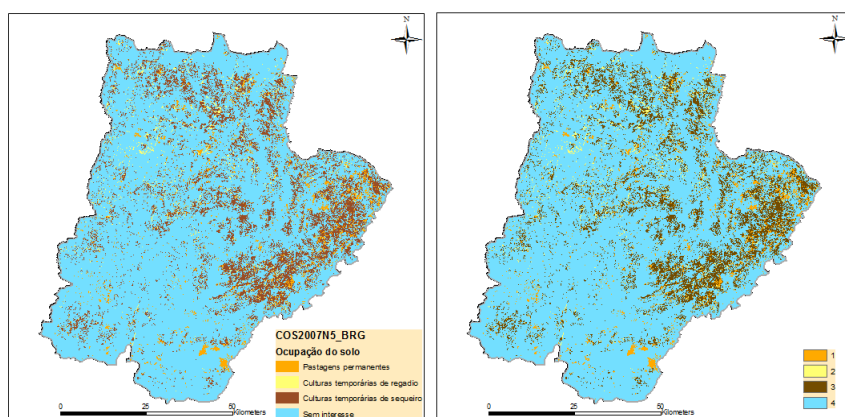


Figura 8. Classes de ocupação do solo potencialmente disponíveis para a cultura do lúpulo. Às classes de ocupação desejadas atribuiu-se o valor numérico por ordem inversa de importância (1 a 3) e 4 aos restantes que não interessam.

Resultados e Conclusões

Da modelação geográfica descrita resultou um mapa com a **Macrozonagem** da Aptidão do Solo para a Cultura do Lúpulo em Bragança, que se apresenta na Figura 9. Na Tabela 1 é indicada a área em hectares por concelho e por classe de aptidão para a cultura do lúpulo no concelho de Bragança (Classe não adequada: 0; Classe mais adequada: 5). Esta modelação baseou-se numa análise multicritérios com combinação linear ponderada de diversa informação geográfica, a qual pode ser gradualmente alterada no sentido de refinar os resultados obtidos. Bragança é o concelho com maior área de elevada aptidão (1.451ha), seguido por Vinhais (523ha) e depois Vimioso e Macedo de Cavaleiros (390ha e 144ha, respectivamente).

A **Microzonagem** deverá ser realizada localmente considerando os pressupostos indicados atrás, isto é, locais com acesso rodoviário, parcelas com dimensão e forma regulares (parcelas com superfície mínima de 0.25ha e de forma geométrica quadrada ou rectangular e ainda garantindo uma área de exploração agrupada de 6ha por unidade de equipamento de colheita e secagem do lúpulo).

Foram analisados com maior detalhe algumas situações que se sabe estarem actualmente ocupadas com esta cultura do lúpulo, ou que já estiveram mas apresentam-se agora abandonadas. Em alguns destes casos as estruturas permanecem em bom estado e

Através da Figura 10 podemos verificar que no Campus de Sta Apolónia as zonas de lameiro anexas ao rio Fervença foram classificadas com a máxima aptidão havendo concordância com a real aptidão.



Figura 10. Campus de Sta Apolónia – IPB. A classe de aptidão 5 (azul escuro) é a mais adequada e a classe 1 a menos adequada (vermelho).

A exploração do Sr. Rodrigues (associado da BRALÚPULO), um dos actuais produtores de lúpulo, enquadra-se nas classes de aptidão 4 e 5 (Figura 11). Deveria ter a maior aptidão mas o sistema desconhecia que existe abundância de água subterrânea para rega através de captação realizada pelo produtor. Assim, verifica-se que a qualidade da informação interfere directamente na estimação do modelo.

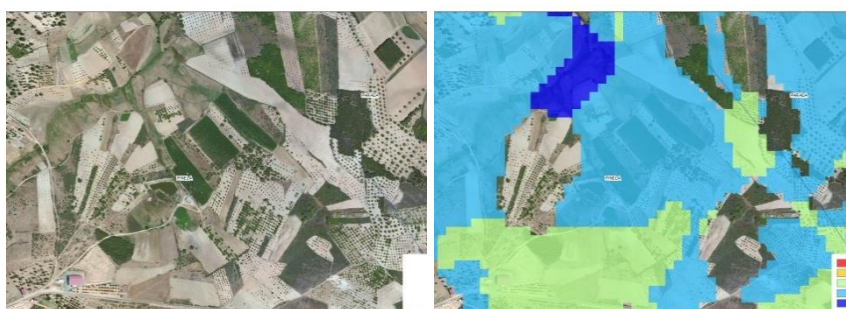


Figura 11. Pinela – Exploração do Sr. Rodrigues (associado da BRALÚPULO)

Na Figura 12 apresenta-se o resultado do modelo para Vinhas, na exploração do Eng. Sá Morais, também associado da BRALÚPULO e produtor actual. Neste caso o modelo não atribuiu a máxima aptidão por dois principais factores: 1) o local enquadra-se numa região climática de transição e 2) o local fica a cerca de 40 km de distância de Bragança. Pudemos constatar que o campo de lúpulo é excelente embora em anos mais quentes e secos o desenvolvimento vegetativo possa ser prejudicado. Em consideração com a distância a Bragança, este factor não deveria ter tido um peso tão elevado porque o proprietário dispõe de equipamento de colheita, de secagem e de enfardamento.



Figura 12. Vinhas – Exploração do Eng. Sá Morais (associado da BRALÚPULO)

A região de Gimonde (Figura 13) e a Veiga de Gostei (Figura 14) são excelentes para a produção de lúpulo mas infelizmente não existem campos em produção. A modelação geográfica atribuiu para estes locais a máxima aptidão havendo concordância com a informação real. Na Veiga de São Joanico (Figura 15), junto às margens do Rio Angueira, ocorre lúpulo espontaneamente. É um bom exemplo de locais onde abundam terrenos disponíveis com excelente aptidão para a cultura do lúpulo.

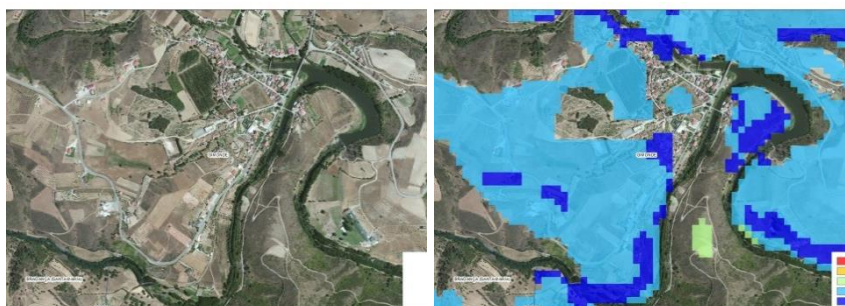


Figura 13. Gimonde. Explorações descontinuadas recentemente do Sr Sá, Eng. Godinho ou Sr. Zezinho (avô do Sr. Luís Miguel Pinheiro)

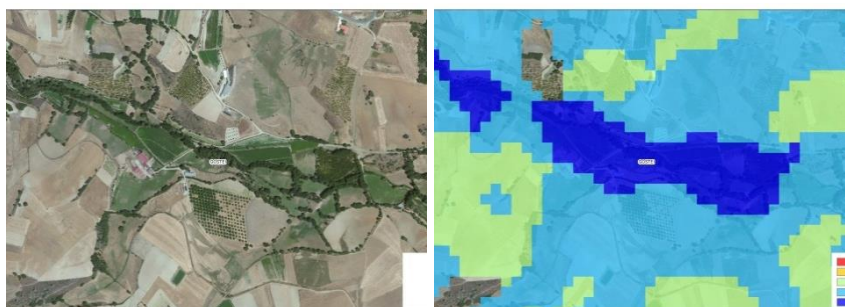


Figura 14. Veiga de Gostei – Exploração descontinuada

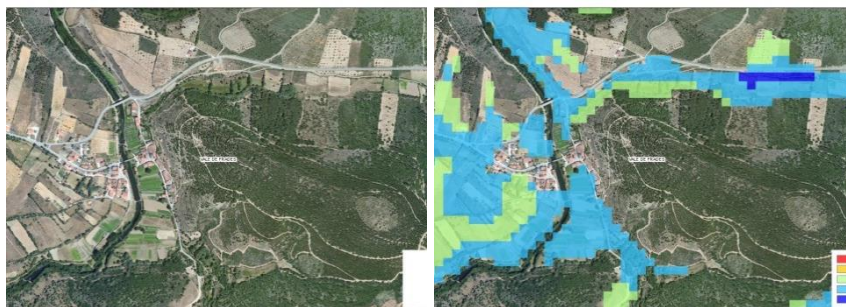


Figura 15. Veiga de São Joanico – margens do Rio Angueira (um local onde ocorre lúpulo espontaneamente)

Na Figura 16 é apresentado o local mais emblemático porque foi onde se iniciou a cultura do lúpulo em Bragança – Qta de Rica Fé, Bragança, pertencente à família de Dr. Carmona e Lima. A exploração foi descontinuada mas malgrado a exploração esteja descontinuada, os locais possuem a máxima aptidão para cultura do lúpulo, e as estruturas permanecem em boas condições (Figura 17).



Figura 16. Qta de Rica Fé - Bragança – família de Dr. Carmona e Lima. Local onde se iniciou a cultura do lúpulo em Bragança. Exploração descontinuada.



Figura 17. Qta de Rica Fé - Bragança – família de Dr. Carmona e Lima. Local onde se iniciou a cultura do lúpulo em Bragança. Exploração descontinuada. As estruturas estão ainda em boas condições.

Referências

- Agência para a Modernização Administrativa de Portugal, 2015. Sistema de Identificação Parcelar Online (iSIP), 2015.
[http://www.rcc.gov.pt/Directorio/Temas/ServicosCidadao/Paginas/Sistema-de-Identifica%C3%A7%C3%A3o-Parcelar-Online-\(iSIP\).aspx](http://www.rcc.gov.pt/Directorio/Temas/ServicosCidadao/Paginas/Sistema-de-Identifica%C3%A7%C3%A3o-Parcelar-Online-(iSIP).aspx) (consulta em 06-10-2015)
- Belton, V. and Stewart, T., 2002. Multiple criteria decision analysis: an integrated approach. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- BRALÚPULO, 2015. Associação de Produtores de Lúpulo de Bragança, Crl. Informação pessoal em 2015.
- Carmona, M.E. 1982. O lúpulo na casa de Rica Fé. 2as Jornadas Técnicas sobre a Cultura do Lúpulo, Bragança.
- Direcção-Geral do Território, 2015. Carta de Uso e Ocupação do Solo de Portugal Continental para 2007-COS2007.
http://www.dgterritorio.pt/cartografia_e_geodesia/cartografia/cos/cos_2007/ (consulta em 06-10-2015)
- Eastman, J. R., 2005. Multi-criteria evaluation and GIS. In: Longley, P., Goodchild, M. F., Maguire, D.J. and Rhind, D. W. (eds) Geographical information systems. 2nd ed. New York/Toronto: Wiley, pp. 493–502.
- Eastman, J.R., 2009. IDRISI Taiga: guide to GIS and image processing. Worcester, MA: Clark Labs.
- Eastman, J.R., Weigen, J., Kyem, P.A.K. and Toledano, J., 1995. Raster procedures for multi-criteria/multi objective decisions. Photogrammetric Engineering and Remote Sensing 61(5), pp. 539–547.
- Rybáček, V. 1991. Hop Production. Elsevier, New York.
- Saaty, T.L., 1980. The analytic hierarchy process: planning, priority setting, resource allocation. New York/London: McGraw-Hill International Book Co.
- Saaty, T.L., 2008. Decision making with the analytic hierarchy process. Int. J. Services Sciences, Vol.1, No.1, 2008.

Um futuro para a produção de lúpulo em Portugal

Arménio Martins¹

¹Os Três Cervejeiros, Lda. Cerveja artesanal Sovina

Resumo

A nova vaga de produtores de cerveja artesanal no mundo Ocidental cria oportunidades para os produtores de lúpulo em Portugal. A introdução de novas cultivares dirigida ao mercado dos cervejeiros artesanais poderá ser a chave da solução para que as culturas se tornem rentáveis e não se extingam.

Palavras-chave: lúpulo; Trás-os-Montes; cerveja artesanal

Introdução

“Some 2 600 farms in the European Union grow hops, covering 26500 ha - 60% of the total surface area used for hop-growing worldwide.”¹

Comissão Europeia da Agricultura e Desenvolvimento Rural

A produção do lúpulo em Portugal está em vias de extinção.

Sobrevivem dois produtores no Nordeste Transmontano, o Sr. Rodrigues e o Sr. Sá Morais nomeadamente nas aldeias de Pinela e Vinhas. O lúpulo aí produzido é da cultivar Nugget, uma cultivar com grande teor em ácidos Alfa, mas com poucos aromas. Este lúpulo dá resposta às necessidades da indústria cervejeira. É um lúpulo com preço no mercado muito reduzido, comparado com outros lúpulos aromáticos. A flor de lúpulo colhida por estes produtores é transformada na Alemanha.

Este abandono, esta desertificação, deve-se a factores económicos, devido aos custos elevados de produção e também de transformação. Pelo facto de nunca ter havido uma verdadeira unidade/cooperativa de transformação quer seja para a transformação em *pellets* ou extracto esta transformação é feita na Alemanha, que acresce em muito ao valor final, desvalorizando assim o trabalho do produtor.

Este abandono agrícola do lúpulo parece um paradoxo quando temos na região de Trás-os-Montes especialmente no distrito de Bragança, as condições ideais para ser considerada uma das melhores regiões para plantação do lúpulo no mundo.

Nas décadas de 60 e 70 produziam-se no Nordeste Transmontano, cerca de 120 toneladas, Braga era o outro distrito forte na produção, hoje apenas restam 12 hectares de plantação, e apenas da cultivar *Nugget*, para dar resposta ao mercado.

Chegamos a este ponto pelo facto de em Portugal até há pouco tempo haver apenas quatro unidades produtivas cervejeiras (SCC, Unicer, Coral, FontSalem). Estamos a falar de indústrias de grande escala que são geralmente sinónimo de alta rentabilidade económica, onde os lúpulos aromáticos ou de amargor não são premiados como na produção de cerveja artesanal onde há procura por lúpulos nobres e diversificados, que intrinsecamente dão uma mais valia para o produto e também promovem o seu estudo e inovação. Com o crescimento de novas marcas de cervejas artesanais no país, podemos ter uma porta aberta, uma solução para o problema dos produtores.

Com plantações de outras cultivares mais destinadas às cervejas artesanais ou seja lúpulos aromáticos com uma rentabilidade mais acrescida onde os custos de transformação são muito menores (*pelletes*) ou ao natural em flor, seca.

Este precioso néctar indispensável para o fabrico da cerveja é desprezado pela indústria cervejeira mas altamente louvado pelos cervejeiros artesanais. Sem lúpulo não há cerveja, e sem boas cultivares e qualidades de lúpulos não há boas cervejas.

Prevendo o crescimento do mercado da cerveja artesanal em Portugal, como no resto da Europa e com o emprenho das grandes cervejeiras, cervejas artesanais, poder político e local, penso que podemos voltar a produzir lúpulos de grande qualidade e também investigar cultivares selvagens diferentes.

Quem sabe, há uma cultivar própria da região, e aí se interessa patentear como cultura de região demarcada. Daí poderá ser também o futuro da cultura do lúpulo desta região que com certeza terá todo o apoio dos cervejeiros artesanais.

Agradecimentos

Produtores de lúpulo em Portugal, Escola Profissional Agrícola Conde de São Bento e Instituto Politécnico de Bragança,

Referências

Webografia

1. Comissão Europeia da Agricultura e Desenvolvimento Rural:
http://ec.europa.eu/agriculture/hops/index_en.htm

Lúpulo: Aplicación industrial de la tecnología de gases comprimidos.

Cristina Gutierrez¹, Maria T. García¹, Irene Alvarez¹, Ignacio Gracia¹, Juan F. Rodríguez¹

¹Institute of Chemical and Environmental Technology (ITQUIMA). Department of Chemical Engineering. University of Castilla-La Mancha. Faculty of Chemistry. Avda. Camilo José Cela 12, 13071 Ciudad Real, Spain.

Resumen

En la industria agroalimentaria se utiliza de manera habitual procesos para la concentración de los principios activos contenidos en los alimentos mediante diferentes etapas de separación que pueden implicar el uso de disolventes orgánicos. Con el objeto de limitar el uso de este tipo de disolventes no comestibles, incluso tóxicos, se están desarrollando tecnologías de separación más respetuosas con el medio ambiente y que no representen ningún riesgo para salud. El uso de fluidos supercríticos, principalmente CO₂, como disolvente de extracción es una técnica que cumple con todas las exigencias planteadas anteriormente y que además produce productos naturales de gran calidad. En este trabajo se describe la aplicación industrial de esta tecnología para producir los extractos de lúpulo imprescindibles para la elaboración de la cerveza.

Palabras-clave: Lúpulo; Extracción Supercrítica; α y β ácidos; aceites esenciales.

Introducción

De manera habitual, en la industria agroalimentaria se utilizan procesos basados en etapas de separación, bien para recuperar compuestos de interés o bien, para eliminar compuestos indeseables presentes en mezclas más complejas. Los métodos de separación convencionales implican el uso de disolventes orgánicos que suelen ser tóxicos tanto para la salud humana como para el medio ambiente y su uso está siendo limitado progresivamente por la legislación alimentaria. Además estos procesos suelen desarrollarse a temperaturas elevadas lo que supone una degradación de los compuestos de interés para la industria agroalimentaria ya que son termolábiles.

En este marco, se ha desarrollado en las últimas décadas un amplio esfuerzo de investigación con el objeto de desarrollar tecnologías más respetuosas con el medio ambiente y que no representen ningún riesgo para salud. El uso de fluidos supercríticos como disolvente de extracción es una técnica que cumple con todas las exigencias planteadas anteriormente y que además produce productos naturales de gran calidad.

En la actualidad podemos encontrar en nuestra mesa una gran variedad de productos alimentarios producidos con tecnología supercrítica. Algunos ejemplos de estos productos se presentan en la Figura 1. (Brunner, 2005).

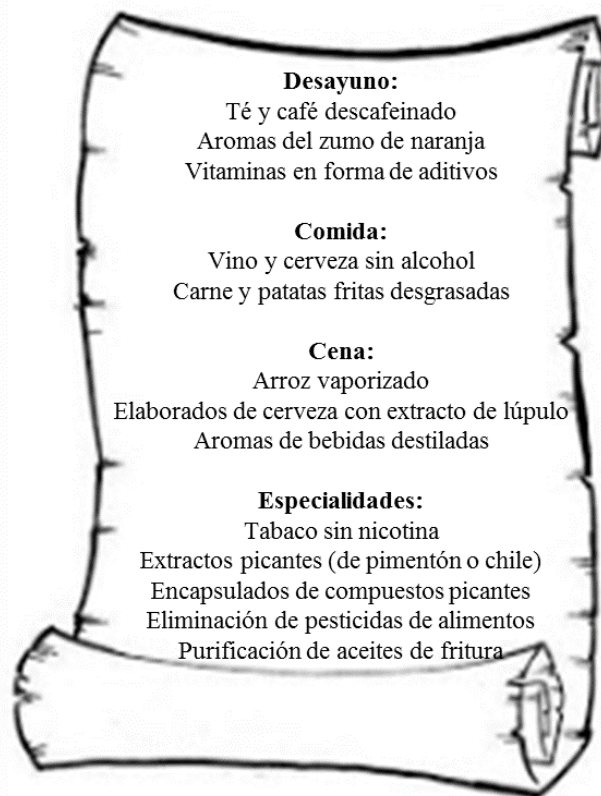


Figura 1. Tecnología Supercrítica aplicada a la comida diaria

¿Pero en que consiste la tecnología de extracción supercrítica? Es una operación unitaria de transferencia de materia en la que se utiliza como agente extractor un fluido en unas condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico. En esas condiciones de operación el fluido posee unas propiedades de transporte (difusividad y viscosidad) parecidas a las de los gases y una densidad parecida a las de los líquidos siendo su poder disolvente próximo al suyo (Luque de Castro et al., 1993) (Tabla 1). Además, al carecer de tensión superficial pueden penetrar fácilmente por los poros o microporos de matrices sólidas haciéndolos especialmente adecuados para ser usados como agentes extractantes en la industria agroalimentaria.

Tabla 1. Propiedades físicas medias en función del estado del fluido.

Estado	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (g/cm s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻⁴	0.2
Fluido Supercrítico	0.3	10 ⁻⁴	0.7 10 ⁻³
Líquido	1	10 ⁻²	10 ⁻⁵

Por otro lado, también es importante saber que el poder disolvente de un fluido supercrítico se puede modificar mediante simples cambios en la presión y temperatura. Esto permite que las condiciones de extracción puedan ser optimizadas para cada componente a extraer.

El dióxido de carbono, CO₂, es el fluido más utilizado en procesos de extracción supercrítica para aplicaciones alimentarias. Es un disolvente que posee unas constantes críticas moderadas (31,1 °C y 72.8 atm) es barato, está disponible en grandes cantidades, no es tóxico (ya que es fácilmente eliminado mediante una simple expansión) ni peligroso, ni inflamable y además puede ser reciclado.

En general el poder disolvente del CO₂ puede ser resumido en los siguientes puntos (Brunner, 1994; del Valle and Aguilera 1999; Brunner 2005): i) disuelve compuestos no polares o ligeramente polares; ii) su poder solvente disminuye a medida que aumenta el peso molecular del componente que se desea extraer; iii) posee alta afinidad por compuestos orgánicos oxigenados de peso molecular medio; iv) ácidos grasos libres y sus glicéridos poseen baja solubilidad; v) los pigmentos son aún menos solubles; vi) proteínas, polisacáridos, azúcares y sales minerales son insolubles y vii) es capaz de separar compuestos menos volátiles, con mayor peso molecular y/o más polares con un incremento de la presión.

El grupo de Procesos de Polimerización y Separación de la UCLM lleva dos décadas desarrollando una amplia labor de investigación en el desarrollo de tecnologías supercríticas para la extracción de sustancias valiosas y de alto valor añadido a partir de sustancias de bajo o nulo valor (materias primas muy abundantes, residuos agroindustriales). En este trabajo vamos a realizar una revisión del estado del arte en referencia a la extracción mediante tecnología supercrítica del extracto del lúpulo y de sus diferentes componentes.

El lúpulo

Los compuestos que forman parte de las glándulas de la flor femenina del lúpulo (lupulina) han sido usados desde la antigüedad debido a sus propiedades terapéuticas (Tyrrell et al., 2012). En la actualidad esta planta es utilizada casi exclusivamente en la industria de la cerveza y está asociada a sus principales características como son el sabor, aroma, espuma, color y estabilidad final del producto (Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2011).

De todos los compuestos presentes en la lupulina, Tabla 2, existen tres grupos que por su importancia en la industria agroalimentaria destacan sobre el resto: resinas, aceites esenciales y polifenoles.

Tabla 2. Composición media de los lúpulos comerciales

Sustancia	Cantidad (%)
Agua	10.0
Resinas totales	15.0
Aceites esenciales	0.5
Polifenoles	4.0
Monosacáridos	2.0
Pectina	2.0
Aminoácidos	0.1
Proteínas	15.0
Lípidos y ceras	3.0
Cenizas	8.0
Celulosa, lignina, etc	40.4

Fuente: Hough, 1981

Las resinas se dividen en dos categorías. Las resinas blandas que son las sustancias responsables de las propiedades organolépticas de la cerveza. Están formadas por dos grupos de ácidos amargos, humulones (α -ácidos) y lupulones (β -ácidos). Ambos tipos poseen homólogos tales como co- and ad- (Verzele et al., 1978; Donadini, 2003; Formato et al., 2013). Los α -ácidos son los más importantes en cuanto a su aporte de amargor, estabilidad microbiológica y de la espuma. Durante el proceso de fabricación de la cerveza, estos compuestos sufren diferentes reacciones químicas principalmente de isomerización e hidrolisis formando los iso- α -ácidos que son los responsables de las características finales de la cerveza. Las resinas pesadas no poseen ningún interés desde el punto de vista agroalimentario.

Los aceites esenciales presentes en las glándulas de lupulina están fundamentalmente formados por hidrocarburos terpénicos, sesquiterpénicos y sus

derivados oxigenados entre los que predominan mircenos, α -humuleno y β -cariofleno (Eyres y Dufour, 2009). Estos compuestos son los que confieren a la cerveza su aroma característico.

De los polifenoles presentes en el lúpulo, en torno al 80% poseen un peso molecular muy elevado, tal como el flavonol. El 20% restante está formado por compuestos de menor peso molecular tales como catequina o proantocianidinas, ácidos fenólicos (ácido ferúlico) y flavonoides (quercitina y kaempferol) entre muchos otros (Magalhães et al., 2009). Las fracciones de bajo peso molecular producen un efecto positivo en el sabor de la cerveza y contribuyen a preservar la estabilidad en el aroma ya que se comportan como antioxidantes naturales. Los que poseen pesos moleculares elevados tienen tendencia a precipitar junto con la fracción proteica durante el proceso de elaboración (Guillaume et al., 2001).

Extracción del lúpulo con fluidos comprimidos

A nivel industrial se han desarrollado básicamente dos procesos, uno para la obtención de extractos de lúpulo y otro para la obtención de aceites esenciales. A continuación se va a proceder a describir dichos procesos.

Extracto de lúpulo

Para la fabricación de la cerveza a nivel industrial, en lugar de lúpulo fresco se utilizan pellets o extractos de lúpulo, en la Tabla 3 aparecen las ventajas e inconvenientes del uso de cada uno de ellos.

Los extractos de lúpulo son concentrados de α -ácidos y aceites esenciales de composición uniforme y de menor volumen que el lúpulo fresco lo que facilita su transporte y almacenaje (Laws, 1981). Pero lo que sin duda hace más atractivo el uso del extracto del lúpulo es su mayor estabilidad, mientras que el lúpulo fresco puede perder un 30 % de α -ácidos en un año de almacenaje y hasta un 50% en dos años (Gardner, 1980) el extracto del lúpulo puede ser almacenado durante un periodo de entre 2 y 5 años sin pérdida significativa del contenido en α -ácidos. (Sharpe and Crabb, 1980; Canabas et al., 2001). Comparados con los pellets, el extracto es más puro ya que elimina la práctica totalidad de los contaminantes presentes en la planta.

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes del uso del lúpulo fresco, pellets y extracto en el proceso de fabricación de la cerveza

Flor de lúpulo		Pellets		Extracto	
Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes	Ventajas
Pérdida de masa	Producto natural	Alto nivel de contaminantes	Estabilidad α -ácidos	Menor percepción de aromas	Mayor pureza
Ineficiente		Bajo potencial para producir cervezas especiales	Mejor conservación	Proceso costoso	Estabilidad α -ácidos
Inestable			Mayor estandarización		Mejor conservación
Contaminación			Menor volumen		Mayor estandarización
Alto coste transporte y almacenamiento					Menor volumen
					Eliminación de pesticidas

Inicialmente, a escala industrial los extractos de lúpulo se obtenían mediante disolventes orgánicos tales como etanol (o metanol) cloruro de metileno y hexano. Estos disolvente tenían una serie de inconvenientes, asociados directamente al uso del disolvente, como son la generación de residuos orgánicos o la existencia de trazas de los mismos en el producto final, o bien, inconvenientes asociados al proceso de separación del mismo, como son pérdidas de productos volátiles (que son los que confieren el aroma a la cerveza) y un gran consumo energético.

En 1965 en Rusia aparece la primera patente que reporta el uso de CO₂ para producir extractos de lúpulo (Pechov et al., 1965), en este trabajo se expone que es posible recuperar el 90% del total de extractables del lúpulo aunque no se indican las condiciones de presión y temperatura a la que se opera. En 1970 una patente japonesa (Kako, et al., 1970) describe el uso del CO₂ para extraer lúpulo en un rango de temperaturas de entre -15 y 25°C. A partir de ese momento dos grandes compañías patentaron procesos donde se utiliza el CO₂ como disolvente para extracción del lúpulo.

El primero de ellos fue desarrollado por Distiller Company (Carbon Dioxide) Ltd. and the Brewing Research Foundation, en el cual se utiliza CO₂ en estado líquido en un rango de temperaturas de entre -10 y 15°C y un rango de presiones de entre 40-60 atmósferas (Wheldon and Cockerill, 1979; Bath, 1980). Por otro lado, la compañía alemana Hag Aktiengesellschaft propuso el uso del CO₂ en estado supercrítico con una temperatura de operación de entre 45-50°C y un rango de presiones de entre 300-400

atmosferas. En la Tabla 4 se muestra la comparación de los extractos obtenidos utilizando ambos métodos (Laws, 1981)

Tabla 4. Composición de los extractos obtenidos utilizando CO₂ como agente extractor

Componente	Lúpulo seco (%peso)	Extracción con CO ₂ líquido (%peso)	Extracción con CO ₂ supercrítico (%peso)
Resinas totales	14-21	80-98	77-98
α- ácidos	12-13	35-55	27-41
β-ácidos	14	25-35	43-53
Aceites esenciales	0,2-0,8	3-10	1-5
Resinas pesadas	3-4	-	5-11
Polifenoles	3-6	-	0,1-5
Agua	10-12,5	0-2	1-7
Lípidos y cera	3	0-8	4-13
Celulosa	40,4	-	-

En la Tabla 4 se puede observar que ambos extractos son adecuados para su uso industrial ya que el rendimiento de extracción en α-ácidos es superior al mínimo necesario del 95% (Raventos, 2003) y en algunas condiciones de operación se alcanza incluso el 99% del contenido total inicial. Comparando ambos extractos podemos observar que el CO₂ en estado líquido es más selectivo hacia los compuestos que presentan mayor interés. Además, al realizar la extracción a temperaturas inferiores se conservan mejor los aromas presentes en los aceites esenciales. Sin embargo, en estas condiciones no se recuperan ninguna fracción de compuestos polifenólicos, ya que poseen pesos moleculares muy elevados y son poco solubles en CO₂ líquido.

Pero sin duda la principal ventaja que posee la operación en condiciones supercríticas es la gran flexibilidad que posee este tipo de procesos, ya que las condiciones de operación pueden ser escogidas para asegurar la extracción de cualquier material que pueda aportar características positivas al extracto. La misma planta puede trabajar en condiciones más suaves si necesitamos recuperar los aromas de una planta de lúpulo particular. Por otro lado, estas plantas pueden ser multipropósito, es decir, además de trabajar con el lúpulo pueden extraer cualquier otra materia prima sin más que ajustar las variables presión y temperatura.

Pues teniendo en cuenta las ventajas que presentan cada uno de estos dos proyectos a partir de los años 80 comenzaran a implantarse a nivel industrial plantas donde se utiliza como disolvente CO₂ en estado líquido o supercrítico. Así la primera planta se construyó en Australia en 1980, seguida de una en Alemania y otra en Inglaterra. Las plantas que operan en la actualidad se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Plantas comerciales de extracción de lúpulo

Compañías en operación
Pfizer Hops Extraction, Sydney, Nebraska
Hopfenextraktion, HVG, Barth, Raiser and Co.
SKW Trostberg, Munchsmunster, Germany
Natal Cane By-Products Ltd., South Africa
Barth and Co., Wolnzach, Germany
Hops Extraction Corp. Of America, Yakima Washington
J.I. Hass, Inc., Yakima Washington
Pitt-Des Moines, Inc., Pittsburgh, USA
Carlton, United Breweries, United Kingdom
NORAC, Canada

Fuente: Chemical Engineering Research Information Center (www.cheric.org)

Extracción de aceites esenciales del lúpulo

El aroma de la cerveza es una de sus características más importantes. En su proceso de fabricación, comúnmente se añaden lúpulos aromáticos en diferentes etapas: durante la producción, en la etapa final o en la etapa de envejecimiento de la cerveza (Van Opstaele et al., 2012). Esta práctica conlleva variaciones en las características aromáticas del producto final, pero también puede afectar al sabor de la cerveza (Irwin, 1989; Hughes y Simpson, 1994; Kaltner et al., 2001; Van Opstaele et al., 2006; Takemura et al., 2007; Herrmann et al., 2008).

Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado diferentes productos basados en aceites esenciales procedentes del lúpulo (Gardner, 1994; Benitez et al., 1997; Marriott., 2001; De Cooman et al., 2004) que pueden ser añadidos a la cerveza como aditivos. Los aceites esenciales habitualmente han sido aislados usando un proceso de hidrodestilación, sin embargo, el producto final no posee buenas características aromáticas, ya que se producen reacciones de degradación térmica del aceite, hidrolisis y solubilización en agua de parte de los compuestos que forman parte de los aceites, variando el perfil aromático y de sabor de los aceites (Reverchon y De Marco, 2006).

En 1970 se comenzó a utilizar el CO₂ para extraer de una manera selectiva estos aceites esenciales en unas condiciones de operación que evitaran o limitaran cambios químicos en la composición original de los aceites (Van Opstaele et al., 2012a). El proceso de extracción se realiza en dos pasos. Primero, utilizando CO₂ líquido (60-65 bar y 5-15°C) o supercrítico (200-250 bar y 40-60°C) se obtiene un extracto formado por las resinas más los aceites. En otras ocasiones y para limitar la extracción de otros

compuestos se realiza una extracción parcial del lúpulo utilizando CO₂ líquido a muy bajas temperaturas (0 °C, 60 bar) o CO₂ supercrítico a relativamente bajas presiones (40–60 °C, up to 120 bar) (Benitez and col., 1997). En un segundo paso se aíslan los aceites esenciales mediante destilación con corriente de vapor (a vacío o a presión atmosférica) o preferiblemente mediante destilación molecular a baja temperatura utilizando vacío (Benitez, 1997; Eyres et al., 2007).

En la actualidad se están desarrollando métodos que utilizan tan solo la extracción supercrítica para la extracción y posterior fraccionamiento de los aceites mediante la variación de la densidad del CO₂ durante el proceso de fraccionamiento, con el objetivo obtener fracciones de aceites con distintas notas aromáticas (carácter global del lúpulo, carácter floral, cítrico o picante) (Van Opstaele, , 2012 a; Van Opstaele, , 2012 b).

Conclusiones

En la industria agroalimentaria cada vez existe una mayor implantación de procesos de separación y obtención de productos de alto valor añadido de forma limpia y segura basados en la tecnología de fluidos comprimidos. Uno de los primeros procesos de este tipo en implantarse a nivel industrial fue el proceso de extracción del lúpulo, ya que mediante este procedimiento se consigue obtener concentrados de α -ácidos y aceites esenciales muy puros, de composición uniforme, de menor volumen que el lúpulo fresco lo que facilita su transporte y almacenaje y muy estables.

Referencias

- Bath, L. 1980. British Patent 1 576 729.
- Benitez, J.L. Forster, A., De Keukeleire, D., Moir, M., Sharpe, F.R., Verhagen, L.C., Westwood, K.T. 1997. European brewery convention manual of good practice: hops and hop products, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Brunner, G. 1994. Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. New York, NY: Springer.
- Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67: 21-33.
- Canabas, A., Erten, H., Ozsahin, F. 2001. The effect of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochemistry*. 36:1053–1058.
- De Cooman, L., Aerts, G., Van Opstaele, F., Goiris, K., Sryn, E., De Rouck, G., De Ridder, D., De Keukeleire, D. 2004. New trends in advanced hopping – Part 2: application of varietal hop aromas. *Cerevisia*, 29 (2): 81–87.

- Del Valle, J.M., Aguilera, J.M. 1999. Extraction con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones a la industria de alimentos. *Food Science and Technology International*, 5:1-24.
- Donadini G. 2003. Il Luppolo: qualità e tecnologia. *Rivista Italiana EPPOS*. 35: 13–32.
- Eyres, G.T., Marriott, G.T. Dufour, J.P. 2007. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6252–6261.
- Eyres, G., Dufour, J.P. 2009. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. *Beer in Health and Disease Prevention*: 239–254.
- Formato, A., Gallo, M., Ianniello, D., Montesano, D., Naviglio, D. 2013. Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid–liquid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84, December: 113-120.
- Gardner, D. 1994. Hop flavour and aroma products. EBC Monograph 22 Fachverlag Hans Carl, Nürnberg: 114–124.
- Guillaume, L., Liégeois, C., Collin, S. 2001. Reducing power of hop cultivars and beer ageing *Food Chemistry*. 72: 413–418.
- Herrmann, M., Hanke, S., Kaltner, D., Back, W. 2008. Hop volatile compounds (Part I): analysis of hop pellets and seasonal variations. *Brewing Science (July–August)*: 135–139.
- Hughes, P.S., Simpson, W.J.. 1994. Sensory impact of hop-derived compounds EBC Monograph, vol. 22 Fachverlag Hans Carl, Nürnberg: 128–140.
- Irwin, A.J. 1989. Varietal dependence of hop flavour volatiles in lager *Journal Institute of Brewing*, 95: 185–194
- Kako, K, Hagiya, J. Yonemura, M. 1970. Japanese Patent 122,110.
- Kaltner, D., Thum, B., Forster, C., Back, W. 2001. Hops – Investigations into technical and flavor effects in beer *Brauwelt International*: 40–45.
- Laws, D.R.J. 1981. Hop-extract- a review.. *J.Inst. Brew*, January-February.87: 24-29.
- Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., Valcárcel Cases, M. 1993. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Barcelona, Editorial: Reverte.
- Magalhães, P.J., Carvalho, D.O., Cruz, J.M., Guido, L.F., Barros, A.A. 2009. *Nat. Prod. Commun.*, 4: 591.
- Marriott, R. 2001. Hop aroma products and their application in brewing. EBC Monograph 31, Contribution 12, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg: 1–5.
- Pechov, A.V., Ponomaresko, I, Prokopcuk A.F. 1965. USSR. Patent specification 167,798.
- Reverchon, E., De Marco, I. 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*. 38: 146-166.
- Sharpe, F.R., Crabb. D. 1980. Pilot plant extraction of hops with Liquid Carbon dioxide and the use of these extract in pilot and production scale brewing. *Journal of Institute of Brewing.*, March-April, 86: 60-64.
- Takemura, H. Kawasaki, Y., Ogane, O., Imai, T., Ogawa, Y. 2007. The influence of hop storage conditions on the quality of aroma and bitterness in beer. *Proceedings of the*

31st Congress of the European Brewery Convention, Contribution 28, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg : 1–11.

- Tyrrell, E., Archer, R., Tucknott, M., Colston, K., Pirianov, D. 2012. The synthesis and anticancer effects of a range of natural and unnatural hop b-acids on breast cancer cells. *Phytochemistry Letters*, 5: 144–149.
- Van Opstaele, F., Goiris, K., Stryn, E., Rouck, G. De, Jaskula, B. De Clippeleer, J. Aerts, G., De Cooman, L. 2006. Hop: aroma and bitterness perception. *Cerevisia*, 31 (4): 167–188.
- Van Opstaele, F., Goiris, K., Rouck, Aerts, G., Cooman, L. 2012a. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets—Part 1: Preparation of single variety total hop essential oils and polar hop essences. *The Journal of Supercritical Fluids*. 9: 45–56.
- Van Opstaele, F., Goiris, K., Rouck, Aerts, G., Cooman, L. 2012b. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets—Part 2: Preparation of single variety floral, citrus, and spicy hop oil essences by density programmed supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*., November: 147–161
- Verzele, M., Potter, M.D.E. 1978. High-performance liquid chromatography of hop bitter substances. *Journal Chromatography*, 166 (1): 320–326.
- Wheldon A.G, Cockerill P.E. 1979. British Patent, 1 557 123.

patrocínios



ISBN 978-972-745-202-6



9 789727 452026