



Universidad Nacional de La Plata

Trabajo final de grado de la Facultad de Ciencias Exactas

**Agregado de frutos patagónicos de *Berberis microphylla* G. Forst “calafate” en cerveza artesanal:
Efecto sobre la capacidad antioxidante**

Alumna: Jazmín Berenice Hurtado

Director: Dr. Luis M Rodoni

Codirectora: Dra. María Laura Lemoine

Contacto: bere_2188@hotmail.com



Facultad de Ciencias Exactas

Año: 2021

Este trabajo final de carrera fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, para optar al grado académico de Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Miriam E Arena por proporcionar los frutos de calafate para la realización del trabajo y por la colaboración.

Al Centro de Investigación en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por facilitarnos el liofilizador para el secado de las muestras de calafate.

A Cervecería Laurus S.A. por brindarnos el espacio físico para la elaboración de la cerveza, y la buena predisposición.

A la cátedra de Agroindustrias y el LIPA por hacerme sentir parte de la hermosa familia que son.

A mis directores, los Dres Luis M. Rodoni y María Laura Lemoine, por la paciencia, los conocimientos aprendidos, y su calidez humana. A Federico Pintos y Ulises Fontana por acompañarme en el desarrollo de este trabajo.

A la ciudad de La Plata y la Universidad, por albergarme y formarme todos estos años.

A los Dres y profesores María José Zaro, Martín Torrez y Claudio Voget.

A mi familia por saber entender procesos, cambios y tiempos. Por todo su amor.

A Carlos por su escucha, comprensión y confianza.

A mis amigos que fueron como mi familia en esta ciudad, gracias a cada uno por todo lo compartido.

A Rodo por ser luz.

RESÚMEN

La cerveza es una de las bebidas más consumidas en el mundo. Actualmente existe un auge en la producción de cervezas artesanales o especiales. Un estilo que está incrementando su popularidad a nivel mundial y en Argentina es el de cervezas *sour* o cervezas ácidas. La elaboración de las mismas incorpora una fermentación láctica antes de la fermentación alcohólica. Esta modificación del proceso otorga a las cervezas *sour* características distintivas de sabor y aroma, una elevada acidez y bajo pH.

Los calafates son frutos *berries* que crecen de forma silvestre en la zona Andino-Patagónica de Argentina y Chile. Los frutos de calafate son extraordinariamente ricos en antocianinas y antioxidantes. En este trabajo se evaluó la calidad y estabilidad de una cerveza *sour* enriquecida con frutos de calafate liofilizados. En una primera instancia se elaboraron cervezas con diferentes niveles de calafate (0; 2,5; 5 y 10 g L⁻¹). Las cervezas enriquecidas con calafate tuvieron entre 2-4 veces mayor capacidad antioxidante que el control, mientras que el nivel de antocianinas incorporadas fue de entre 30-100 mg D3G L⁻¹. La adición del calafate provocó un marcado cambio de color de la cerveza hacia tonos rojo rubí que quedó evidenciado por los cambios en los parámetros *CIELab* y la *Abs_{520nm}*. No se afectó de forma relevante el pH, la acidez o densidad de la cerveza. Entre los diferentes niveles de fruta analizados, las cervezas con 5 y 10 g L⁻¹ de calafate obtuvieron los mayores puntajes por parte de jueces entrenados. La cerveza con 5 g L⁻¹ de calafate obtuvo mejores puntuaciones en color y sabor en comparación a la cerveza base (control) en el ensayo de aceptabilidad de consumidores.

En una segunda instancia se evaluaron las propiedades antioxidantes, fisicoquímicas y sensoriales de cervezas control (sin fruta) o con 5 g L⁻¹ de calafate durante el almacenamiento en botella a 5 °C hasta 90 d. En la cerveza con calafate la capacidad antioxidante, el nivel de antocianinas, el porcentaje de ionización de antocianinas y el índice de polimerización permanecieron estables. En la cerveza control un incremento de la capacidad antioxidante y los fenoles fue detectado luego de 30 d. La cerveza con calafate mantuvo los puntajes de sus atributos sensoriales inalterables luego de 90 días a 5 °C, mientras que en la cerveza control los puntajes de acidez y balance se vieron reducidos luego del mismo período de almacenamiento.

Este trabajo muestra una nueva alternativa para aprovechar los frutos de calafate generando un nuevo producto con elevado valor agregado. Los frutos de calafate poseen una limitada vida poscosecha, pero pueden ser estabilizados mediante secado para poder ser almacenados o transportados a diferentes mercados. Debido a su

elevado nivel de antocianinas, la adición de cantidades relativamente bajas de calafate liofilizado (desde 2,5 g L⁻¹) provocó un marcado cambio del color de la cerveza sin alterar negativamente otros parámetros importantes. El bajo pH de la cerveza *sour* fue conveniente para maximizar el poder colorante del calafate, al tiempo que mejoró la estabilidad y el color durante el almacenamiento. En resumen, los resultados muestran que la adición de calafate a cerveza tipo *sour* puede ser una buena opción para obtener un producto atractivo y estable enriquecido con antioxidantes naturales.

Palabras clave: "calafate", Andino-Patagónico, bebida roja, berries, antioxidantes.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Características generales de la cerveza.....	01
1.1.1. Definición y elaboración de cerveza.....	01
a. Breve reseña histórica y definición de cerveza.....	01
b. Elaboración de cerveza.....	01
1.1.2. Generalidades de las materias primas de la cerveza.....	03
a. El agua.....	03
b. La malta.....	04
c. La levadura.....	06
d. El lúpulo.....	07
1.1.3. Estilos de cerveza.....	09
a. Generalidades.....	09
b. Tipo de malta.....	10
c. Tipo de fermentación.....	10
d. Cervezas tipo <i>sour</i>	11
1.1.4. Mercado internacional de cerveza.....	12
a. Producción y consumo mundial.....	12
b. Cervezas artesanales.....	14
1.1.5. El mercado argentino de cerveza.....	14
a. Consumo.....	14
b. Relevancia para la agroindustria nacional.....	14
c. Cervezas artesanales en Argentina.....	15
1.1.6. Propiedades nutricionales de la cerveza.....	15
a. Composición.....	15
b. Efectos beneficiosos sobre la salud.....	17
1.1.7. Incorporación de vegetales a la cerveza (cervezas con fruta).....	19
1.2. Características generales del fruto de calafate.....	20
1.2.1. Características de la planta y el fruto de calafate.....	20
a. La planta.....	20

b. Los frutos.....	20
1.2.2. Manejo del fruto de calafate.....	21
a. Cosecha.....	21
b. Poscosecha.....	21
c. Estabilización de los frutos.....	22
1.2.3. Características nutricionales del calafate.....	22
a. Composición del calafate.....	22
b. Propiedades antioxidantes y antocianinas del calafate.....	23
1.2.4. El calafate en la industria alimenticia.....	25
a. Antecedentes.....	25
b. Potencialidades y objetivo general.....	26
2. MATEIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. Material vegetal.....	27
2.2. Elaboración de cerveza.....	27
2.3. Adición de calafate.....	28
2.4. Almacenamiento de la cerveza.....	29
2.5. Análisis de calidad.....	29
2.5.1. Desgasificación de las muestras.....	29
2.5.2. Color EBC, color rojo y densidad de color.....	29
2.5.3. Color CIELab.....	30
2.5.4. pH, acidez y densidad.....	30
2.5.5. Antocianinas.....	30
2.5.6. Ionización, color polimérico e índice de pardeamiento.....	31
2.5.7. TEAC.....	32
2.5.8. Fenoles.....	32
2.5.9. Análisis sensorial.....	33
2.5.10. Análisis estadístico.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo general.....	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35

4.1. Influencia de la adición de calafate en las propiedades antioxidantes, fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza.....	35
4.1.1. Efecto de la adición de calafate en la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cerveza.....	35
4.1.2. Efecto de la adición de calafate en las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza.....	37
4.2. Calidad de la cerveza durante el almacenamiento.....	41
4.2.1. Análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la cerveza durante el almacenamiento.....	41
4.2.2. Análisis de las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza durante el almacenamiento.....	46
5. CONCLUSIONES.....	49
6. ANEXO.....	50
7. REFERENCIAS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Producción de cerveza a nivel mundial (artesanal + industrial) y posición relativa de la producción argentina.....	13
TABLA 2: Composición nutricional de una cerveza tipo.....	16
TABLA 3: Composición en fenoles de una cerveza tipo.....	18
TABLA 4: Composición de los frutos del calafate.....	24
TABLA 5: pH, acidez titulable y densidad de la cerveza <i>sour</i> enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 g L ⁻¹ de calafate liofilizado.....	40
TABLA 6: Análisis sensorial con consumidores no entrenados, de las cervezas control o con 5 g L ⁻¹ de calafate.....	41
TABLA 7: pH, acidez titulable y densidad de la cerveza <i>sour</i> control o enriquecida con 5 g L ⁻¹ de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado de la elaboración de una cerveza tipo.....	02
Figura 2: Equipo de ósmosis inversa (izquierda) y esquema gráfico de funcionamiento del equipo (derecha).....	04

Figura 3: Grano de cebada germinado (izquierda), grano de cebada (centro) y grano de trigo (derecha).....	06
Figura 4: Sobre de levadura deshidratada (izquierda), levadura deshidratada (centro) y microscopia de levadura <i>S. cerevisiae</i> (derecha).....	07
Figura 5: A. Cultivo de lúpulo en El Bolsón, Rio negro, Argentina; B. Inflorescencia femenina del lúpulo con glándulas amarillas de lupulina visibles; C. Inflorescencias secándose a 60 °C; D. Lúpulo seco a la salida del secadero; E. Pellets de lúpulo.....	08
Figura 6: Ingesta de alcohol (de cerveza) en relación a la incidencia de enfermedades cardiovasculares.	17
Figura 7: Flores de calafate (izquierda) y frutos en la planta (derecha).....	20
Figura 8: Frutos de calafate cosechados.....	21
Figura 9: Frutos de calafate secados por liofilización.....	22
Figura 10: Productos a base de calafate.....	25
Figura 11: Diagrama de flujo de la elaboración de la cerveza realizada.....	28
Figura 12: A. Antocianinas, B. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) y C. Fenoles de la cerveza <i>sour</i> enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 g L ⁻¹ de calafate liofilizado. Se muestra el promedio ± error estándar (<i>n</i> =3). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de <i>p</i> <0,05.....	37
Figura 13: A. Fotos de las cervezas, B. Color EBC (European Brewing Color), C. Color rojo, D. Densidad de color, E. Luminosidad (L*), y parámetros de color F. a* y G. b* de la cerveza <i>sour</i> enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 g L ⁻¹ de calafate liofilizado. Se muestra el promedio ± error estándar (<i>n</i> =3). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de <i>p</i> <0,05.....	39
Figura 14: Promedio de las puntuaciones obtenidas del análisis sensorial con jueces entrenados. de la cerveza <i>sour</i> enriquecida con 2,5; 5 y 10 g L ⁻¹ de calafate liofilizado. Los asteriscos indican diferencias significativas en base al test de Tukey con una significancia de <i>p</i> <0,05; (<i>n</i> =4).....	41
Figura 15: A. Antocianinas, B. Porcentaje de ionización de antocianinas, C. Índice de polimerización, y D. Índice de pardeamiento (L*) de la cerveza <i>sour</i> control o enriquecida con 5 g L ⁻¹ calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio ± error estándar (<i>n</i> =3). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de <i>p</i> <0,05.....	43
Figura 16: A. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) y B. Fenoles de la cerveza <i>sour</i> control o enriquecidas con 5 g L ⁻¹ de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio ±	

error estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$	45
Figura 17: A. Color EBC (European Brewing Color), B. Color rojo, C. Densidad de color, D. Luminosidad (L^*), y parámetros de color E. a^* y F. b^* de la cerveza <i>sour</i> control o enriquecidas con 5 g L^{-1} de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio \pm error estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$	47
Figura 18: Promedios de los puntajes de la evaluación sensorial con jueces entrenados. luego del almacenamiento en botella a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 0 y 90 días de la cerveza <i>sour</i> control (A) y enriquecidas con 5 g L^{-1} de calafate liofilizado (B). Los asteriscos indican diferencias significativas en base al test de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$; ($n=4$).....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de la cerveza

1.1.1. Definición y elaboración de cerveza

a. Breve reseña histórica y definición de cerveza: Se han encontrado registros de elaboración de cerveza hace más de 4.000 años a. C en la zona de la Mesopotamia del Oriente Medio, donde los sumerios humedecían el pan con agua y la levadura fermentaba la mezcla que la convertía en bebida alcohólica. Si bien no se conoce con certeza la fecha y lugar en que comenzó a elaborarse, la cerveza es considerada una de las bebidas alcohólicas más antiguas (**Nelson, 2005; Mundo Cerveza, 2020**).

Se entiende por cerveza a la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura cervecera, del mosto de cereal malteado (mayoritariamente se utiliza cebada) sometido a un proceso de cocción y adición de lúpulo (**CAA, 2020**). De esta manera, los componentes básicos de una cerveza son cuatro: el agua, la malta, la levadura y el lúpulo.

b. Elaboración de cerveza: La **Figura 1** resume de forma esquemática las principales etapas de la elaboración de una cerveza tipo. El proceso de elaboración utilizado en este trabajo se explica de forma más detallada en la *sección 2.2* de los materiales y métodos.

-Maceración: La maceración consiste en adicionar agua al grano malteado partido y someter al mismo a una temperatura de entre 64-70 °C por 60-90 min. En esta etapa se generan sustratos fermentables, maltosa y glucosa, a partir del almidón del grano para la posterior fermentación por parte de la levadura. Esto es posible por las actividades de las enzimas α y β -amilasas propias del grano. También suceden reacciones de proteólisis, lipólisis, así como también un descenso del pH a valores entre 5,2-5,8. Al final de esta etapa se separan el mosto de los restos del grano.

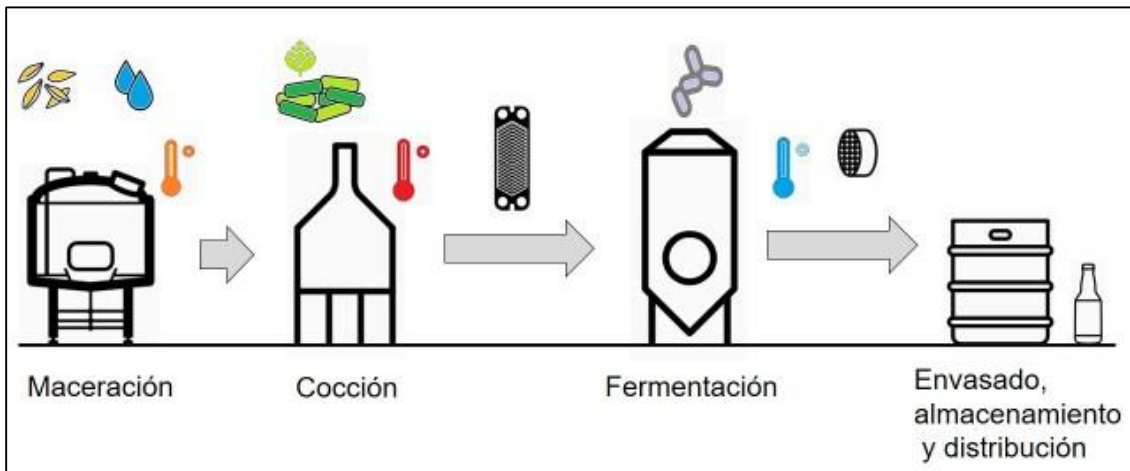


Figura 1: Esquema simplificado de la elaboración de una cerveza tipo. La maceración de la malta en agua se realiza a 60-70 °C, en la cocción se lleva a hervor el mosto y se adiciona el lúpulo, luego del enfriamiento rápido en intercambiadores, el mosto se lleva a los fermentadores donde se inocula con la levadura y se fermenta 10-20 días a 10-18 °C dependiendo del tipo de cerveza. Luego del filtrado las cervezas artesanales se almacenan en refrigeración mientras que las industriales se pasteurizan y se envasan.

-Cocción: El mosto se hierve entre 30-45 min. Se detienen las reacciones enzimáticas y se inactivan microorganismos potencialmente contaminantes. En esta etapa se adiciona el lúpulo. El lúpulo a pH inferior a 6 y temperaturas en torno a 100 °C se isomeriza, pasando de su conformación α -ácido poco soluble, no amargo y aromático a su conformación iso- α -ácido con características de amargor, elevada solubilidad y poco aroma. Luego de la cocción se enfría rápidamente para evitar posibles desarrollos microbianos.

-Fermentación: Las levaduras generan CO₂ y etanol a partir de los azúcares solubles fermentables al tiempo que continúa el descenso del pH a valores próximos a 4,5. Estos tres factores nombrados anteriormente intervienen en la conservación del producto. También se generan compuesto de aroma y sabor. Dependiendo del tipo de fermentación que se utilice, las temperaturas y tiempos rondan entre 10 °C y 20 d para cervezas *Lager* y 18 °C y 10 días para cervezas *Ale*.

-Maduración, carbonatación y envasado: La cerveza se estaciona unas semanas a 0-5 °C. En este lapso se produce una segunda fermentación, con los azúcares remanentes,

parcialmente limitada por la baja temperatura, y se siguen generando compuestos de *flavor*. Este último término se refiere a la percepción combinada del aroma y el sabor. Al final de este paso las proteínas y levaduras floculan por baja temperatura y se vuelven fácilmente separables por filtración. Finalmente, la cerveza se envasa bajo presión de CO₂.

1.1.2. Generalidades de las materias primas de la cerveza

a. El agua: Es el componente mayoritario de la cerveza. Si bien se puede pensar que el agua es sólo un vehículo donde suceden diferentes reacciones en la elaboración actuando como un disolvente en el producto final, este no es el caso. En realidad, la calidad del agua, específicamente su dureza y los iones disueltos, es uno de los aspectos más importantes que los cerveceros deben tener en cuenta si quieren llegar a producir un producto de calidad.

El CaSO₄ posee, entre otros, un efecto reductor del pH que puede favorecer la proteólisis y la hidrólisis del almidón durante la maceración. Las condiciones ácidas reducen también el color del mosto y la astringencia (Ros, 1980). Por otra parte, el calcio interviene en la formación de turbidez luego de la cocción y en la floculación de la levadura finalizada la fermentación. El Mg⁺² es necesario como cofactor para muchas enzimas de la levadura (por ejemplo, la piruvato descarboxilasa, enzima crucial en la síntesis de etanol). Las concentraciones elevadas de iones magnesio son inusuales, pero en tal caso pueden impartir sabor amargo y tener efecto laxante. Se recomienda no sobrepasar los 30 mg L⁻¹. El agregado de NaCl puede emplearse en niveles apropiados (75-150 mg L⁻¹) para mejorar el cuerpo de la bebida. Pero superado este nivel el sodio imparte sabor salado. El alto nivel de bicarbonato en el agua de elaboración es indeseable, ya que impide el correcto descenso del pH durante la maceración, al reaccionar con los protones de los ácidos disueltos desde la malta. Se sugiere que su nivel no supere 50 mg L⁻¹. Los iones metálicos pueden catalizar reacciones de rancidez y favorecer *off-flavors*, gusto metálico y desarrollo de turbidez.

El cobre cataliza la oxidación favoreciendo la inestabilidad del sabor y la turbidez. Los iones hierro por su parte, pueden provocar precipitados rojos de óxidos hidratados o favorecer coloraciones oscuras por la formación de complejos con los fenoles de la malta o el lúpulo. El nivel recomendado de estos iones se encuentra por debajo de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. El sulfato es el principal contraión del calcio en el agua con dureza permanente, aporta sabor amargo y sensación de sequedad. Las concentraciones de sulfato aceptables se ubican en el rango $10\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$. El cloruro en cambio, contribuye al carácter suave de la cerveza. Una concentración máxima razonable es de 150 mg L^{-1} (Kunze, 2006). La relación cloruro/sulfato ayuda a regular el amargor de la cerveza. Pero considerando todo esto, ¿cómo hacen las cervecerías que tienen acceso a agua que no cumple con estas composiciones tan puntuales? Habitualmente remueven la mayoría de los iones mediante ósmosis inversa del agua de red (Figura 2) (Ismail y Matsuura, 2018), y luego adicionan los niveles óptimos de iones en forma de sales, según la cerveza que se busque elaborar. En la sección 2.2 de materiales y métodos se pueden observar más detalles de este último aspecto.

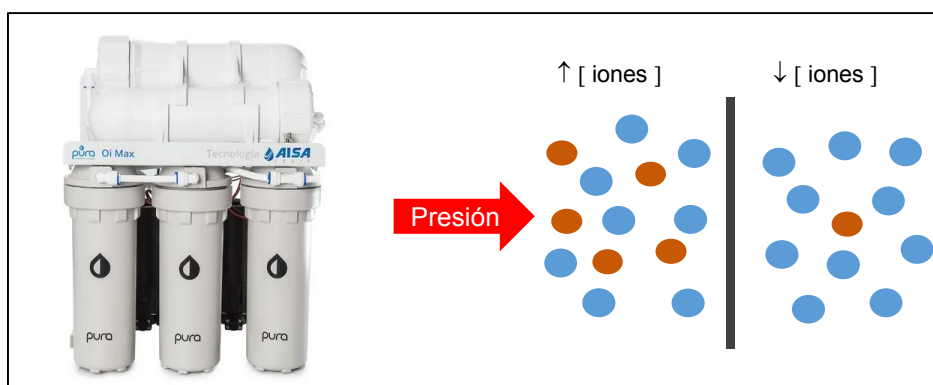


Figura 2: Equipo de osmosis inversa (izquierda) y esquema grafico de funcionamiento del equipo (derecha). Los círculos azules y marrones representan moléculas de agua o iones, respectivamente. La línea vertical representa la membrana de osmosis inversa.

b. La malta: Los granos de cereales deben ser activados para poder ser utilizados en la elaboración. Esto se realiza mediante un proceso denominado malteado. El malteado básicamente consiste en germinar parcialmente el grano de un cereal

mediante la aplicación de humedad y luego el proceso se detiene por calentamiento (**Figura 3**). El objetivo de esta etapa es activar toda la batería enzimática del grano comprendida principalmente por amilasas, pero también por otras enzimas como proteasas y lipasas. Estas enzimas son fundamentales en la etapa de maceración, las amilasas hidrolizan el almidón a azúcares fermentables más simples, mientras que las proteasas y lipasas hacen lo propio con las proteínas y lípidos, respectivamente. Aunque la cerveza puede elaborarse con una amplia variedad de cereales, la cebada ha sido y es el cereal de preferencia para la producción de cerveza dado que además de contar con gran cantidad de almidón, la cáscara de los granos partidos forma un eficaz lecho filtrante para la clarificación del mosto luego de la maceración. También, posee altos niveles de enzimas amilolíticas, su rango de proteínas es adecuado y contiene una concentración de lípidos relativamente baja, estas dos últimas características le confieren buena estabilidad a la cerveza hecha con cebada (**Arias, 1991**). Además de los ingredientes básicos de la producción de cerveza también se admite el agregado de los llamados adjuntos cerveceros (**CAA, 2020**). Los mismos incluyen sustratos fermentables que pueden provenir de cereales como así también de otras fuentes vegetales. Son utilizados para reducir costos de producción, corregir la densidad el mosto a fermentar o conferir a la cerveza determinadas propiedades organolépticas, de estabilidad o funcionales. Es común utilizar otros cereales, más allá de la cebada, en la elaboración de cerveza. Cuando un cereal es utilizado como adjunto, se deberá tener en cuenta la temperatura de gelatinización de su almidón, el contenido de nitrógeno, presencia de cáscara, y nivel de azúcares fermentables (**Priest y Stewart, 2006**). Mientras que en la cebada la temperatura de gelatinización coincide con la temperatura de sacarificación del almidón (hidrólisis del almidón), muchos cereales, como el arroz o el maíz, presentan su punto de gelatinización por encima del rango de 62-65 °C óptimo para las β - y α -amilasas (**Olugbenga y Aberuagba, 2012; Ceppi y Brenna, 2010**), dando como resultado la desactivación de las enzimas antes de que las mismas realicen la sacarificación (**Hager y col., 2014**). Estos cereales suelen adicionarse con su almidón

pregelatinizado y en una proporción no mayor al 15-20 %. En estos casos el potencial enzimático de la malta es suficiente para degradar el almidón adicional (Kunze, 2006). En el caso del trigo, el mismo tiene su temperatura de gelatinización en torno a 58-64 °C, muy próxima a la temperatura de sacarificación, por lo que no presenta problemas con la hidrólisis del almidón. Esto da como resultado elevados rendimientos de extractos, y por ello el trigo suele utilizarse en mayor proporción (50-60 %) que otros cereales y es mucho más habitual encontrar cervezas a base de trigo (Kunze, 2006).



Figura 3: Grano de cebada germinado (izquierda), grano de cebada (centro) y grano de trigo (derecha).

c. La levadura: Es el factor biotecnológico responsable de la elaboración de esta bebida fermentada. Se puede decir que la elaboración de cerveza es una industria de la denominada “biotecnología tradicional”, una combinación entre ciencia, arte y tradición, que ha ido refinándose y mejorando a lo largo de miles de años (Hough, 1990). En sus inicios la fermentación por la levadura era considerada un proceso “mágico”. Esto sucedió en la Mesopotamia, donde nadie entendía que la levadura natural presente en el suelo y las plantas era la responsable de la fermentación (White y Zainasheff, 2010). Explicar científicamente el proceso de elaboración de cerveza no fue posible hasta el siglo XIX, cuando diferentes investigaciones fueron abriendo paso a sucesivas mejoras en las técnicas de elaboración (Hough, 1990). Hoy sabemos que, durante las diferentes etapas del proceso, la liberación de enzimas en el grano de cereal malteado, la degradación de almidón a azúcares simples por parte de esas enzimas y la fermentación del azúcar a etanol y dióxido de carbono, se producen numerosas reacciones e interacciones que definen las características organolépticas o el “*flavor*” de

la cerveza, convirtiéndola en una mezcla muy compleja (Aron y Shellhammer, 2010). Actualmente las levaduras utilizadas en la elaboración de la cerveza han sido minuciosamente estudiadas y seleccionadas. Se utilizan cepas de levaduras del género *Saccharomyces*, entre las que podemos nombrar *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*), las cuales se comercializan secas (se secan por lecho fluidizado) (Figura 4). Comentaremos la diferencia del uso de una u otra especie en la siguiente sección.

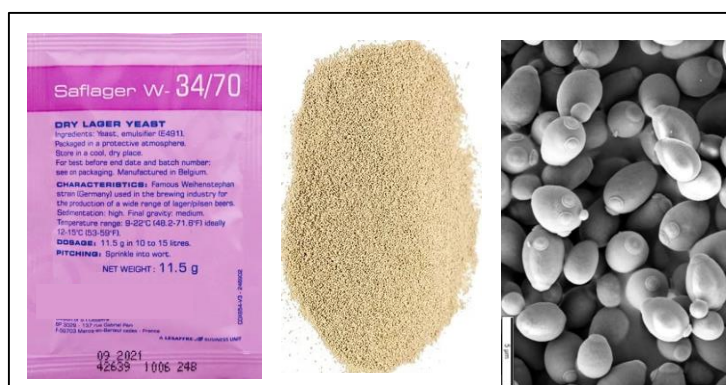


Figura 4: Sobre de levadura deshidratada (izquierda), levadura deshidratada (centro) y microscopia de levadura *S. cerevisiae* (derecha).

d. El lúpulo: El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una de las especies de planta del género *Humulus* de la familia de las cannabáceas. La planta perenne y trepadora desarrolla bien en climas fríos y con largo fotoperiodo. Por ello en nuestro país se cultiva mayoritariamente en el Sudoeste de la provincia de Río Negro. El lúpulo contribuye al sabor y aroma, dado respectivamente por las resinas y aceites esenciales que se encuentran en las glándulas de lupulina de las inflorescencias femeninas de la planta (Caballero y Porras, 2012). Las resinas incluyen principalmente a los denominados α -ácidos cuyo contenido puede variar considerablemente entre 2-16 %. Existen lúpulos que aportan sólo amargor, otros que aportan más aroma y algunas variedades se emplean con ambos propósitos. La cosecha del lúpulo se realiza cuando las brácteas y bractéolas se cierran dando una forma compacta al cono, esto es indicio de que la bractéola terminal cesó su crecimiento. Asimismo, cuando el color de las bractéolas y en menor medida de las brácteas, cambia a verde amarillento, las glándulas de lupulina

están completamente llenas y el aroma del lúpulo se desarrolla plenamente (**Kunze, 2006**). Una vez cosechados los conos se llevan a un nivel de humedad final de alrededor del 10 %. La velocidad del aire y la temperatura tienen que ser controlados cuidadosamente durante el secado puesto que los α -ácidos pueden destruirse. Actualmente un 50 % de la cosecha se procesa en pellets; estos son granulados de lúpulo estabilizados, que se preparan mezclando hasta 2 % en peso de óxido de magnesio (o de calcio) con el polvo de flores de lúpulo (**Figura 5**) (**Caballero y Porras, 2012**). Como se comentó los α -ácidos son insolubles, pero se solubilizan por una reacción de isomerización durante la etapa de cocción. Se considera que como máximo alrededor del 50 % de los α -ácidos disponibles en el lúpulo pueden isomerizarse y pasar a solución. Sumado a esto existen otras pérdidas durante la fermentación, de manera que el rendimiento en cuanto a los principios amargos rara vez excede el 30 % (**Gigliarelli, 2018**). La mayor parte de los aceites esenciales se volatilizan durante la cocción, por tal motivo los cerveceros que deseen aprovechar el aroma del lúpulo pueden adicionarlo hacia el final de la cocción. Alternativamente el lúpulo seco puede añadirse a la cerveza directamente en tanques o barril, lo que se conoce como lupulado en seco o *dry hopping*. Esta técnica se emplea en estilos muy aromáticos como las Indian Pale Ales (IPAs) (**Steele, 2017**). Actualmente algunos cerveceros utilizan extractos de lúpulo ya isomerizados.



Figura 5: A. Cultivo de lúpulo en El Bolsón, Río negro, Argentina; B. Inflorescencia femenina del lúpulo con glándulas amarillas de lupulina visibles; C. Inflorescencias secándose a 60 °C; D. Lúpulo seco a la salida del secadero; E. Pellets de lúpulo.

1.1.3. Estilos de cerveza

a. Generalidades: Los estilos de cerveza son muy variados. Esto sucede debido a que una variación en la calidad o el tipo de agua, malta, levadura o lúpulo, o una variación en las cantidades relativas de este último, darán como resultado cervezas con diferentes características, diferencias que pueden llegar a ser muy marcadas. A esto se le suma el hecho de que algunos estilos incorporan otro tipo de fermentación más allá de la alcohólica, como es el caso de las cervezas *sour* que incorporan una fermentación láctica, las que describiremos más detalladamente hacia el final de esta sección. Para sumar complejidad al tema, las cervezas de venta masiva difieren de las elaboradas a una escala menor o de forma artesanal. *En general las cervezas artesanales son elaboradas por establecimientos pequeños. Los mismos no utilizan conservantes químicos y en la mayoría de los casos las cervezas no se pasteurizan (Carneiro y col., 2006).* Esto hace que las cervezas artesanales sean populares entre los consumidores que buscan reducir el consumo de químicos de síntesis. Por otra parte, la ausencia de un tratamiento térmico conserva los aromas, sabores y propiedades nutritivas del producto. Sin embargo, la ausencia de un tratamiento de estabilización provoca que este tipo de productos deba almacenarse en refrigeración. Si hablamos de los estilos que involucran la incorporación de vegetales o frutas, los mismos están muy ligados a la producción artesanal. En realidad, la gran variedad de cervezas que podemos encontrar actualmente se debe en gran medida a las cervecerías artesanales, que se han focalizado en satisfacer la demanda de los consumidores por nuevos estilos y sabores. Para una primera aproximación a la clasificación de las cervezas se puede tener en cuenta el marcado efecto que tienen tanto el tipo de malta como así también la especie de levadura en las características de la cerveza (**Parker, 2012**).

b. Tipo de malta: En cuanto a la malta, existen diversos tipos que difieren según el método de secado o tostado empleado. El secado a bajas temperaturas (35-60 °C) conduce a las denominadas maltas base, donde se preserva la actividad enzimática de

las amilasas. Las maltas base son irremplazables en la elaboración de cerveza ya que aporta sustratos y enzimas necesarios para la fermentación (Hough, 1990). Son ejemplos de malta base las Pilsen, Viena, Munich, malta de Trigo, Pale Ale, entre otras. Las diferencias entre ellas derivan en la temperatura y tiempo de secado, que provocan diferencias en el color, sabor y aroma. En cambio, las maltas especiales se secan a mayor temperatura que las maltas base (90-250 °C), cambiando su color a tonalidades oscuras. Son ejemplos de maltas especiales las caramelo, chocolate y negra (Caffaratti, 2020). La actividad enzimática de las maltas especiales es nula o casi nula, pero su importancia radica en la capacidad de otorgar color, aroma y sabor (Parker, 2012). La intensidad del color y la formación de compuestos del *flavor* está asociado a reacciones de pardeamiento no enzimáticas y formación de compuestos pardos y volátiles mediante reacciones de Maillard, caramelización y pirólisis (Vanderhaegen y col., 2007). Las maltas especiales se utilizan en menor proporción que la malta base según las características buscadas por el elaborador.

c. Tipo de fermentación: El rol de la levadura en la cerveza es crítico, dado que además de la fermentación alcohólica, produce cerca de 600 compuestos del *flavor* (Parker, 2012). Podemos distinguir dos grandes estilos de cerveza que son determinados por el tipo de levadura utilizado. Las cervezas de fermentación “Ale” y las de fermentación “Lager”. En las primeras se utilizan cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en las Lager cepas de *Saccharomyces pastorianus* (Libkind et. al, 2011). Esta última es un híbrido entre una cepa *Saccharomyces cerevisiae* y una especie que se descubrió en la Patagonia Argentina que le aporta su capacidad de fermentar en frío denominada *Saccharomyces eubayanus* (debido a su parecido con *Saccharomyces bayanus*) (Libkind y Bruzone, 2018). Entre las levaduras Ale y Lager existen diferencias morfológicas, fisiológicas y tecnológicas. Las levaduras Ale fermentan a temperaturas entre 14-25 °C, mientras que las levaduras Lager lo hacen a temperaturas entre 7-15 °C. Las Ale se caracterizan por una fermentación rápida y tienden a formar espuma en la superficie del fermentador. Por el contrario, las Lager no

forman espuma en la superficie dado que su fermentación es más lenta (**Kunze, 2006**). Las *Lager* se caracterizan por ser cervezas “elegantes”, de aromas limpios y acentuados carbónicos, produce muy pocos residuos y relativamente bajos niveles de ésteres y diacetilos. Las *Ale* son las preferidas por los cerveceros artesanales, en parte porque pueden fermentarse en solo 1 o 2 semanas sumado al hecho de que el control de la temperatura durante la fermentación es relativamente más sencillo que cuando se utilizan levaduras *Lager* (**González, 2017**). Además, las *Ale* producen mayores niveles de subproductos de fermentación. Estos compuestos intervienen en el *flavor* y es por esta razón que las *Ale* se consideran cervezas complejas y aromáticas (**Kunze, 2006**). Los ésteres son el principal producto secundario de esta levadura, y son los responsables del aroma frutado, con frecuencia se describe el aroma de los ésteres como a banana, manzana, pera, ananás y otras frutas. Otra característica deseable de la levadura *Ale* es su habilidad para reducir los diacetilos, que confiere a la cerveza un característico sabor a manteca y es indeseable (**Aparicio, 2010; Granada-Díaz y Salamanca-Grosso 2020**). Algunos de los estilos más representativos del grupo de las *Ales* son las cervezas de Trigo, Pale Ale, Lambic, Barley, Stout y Porter. Los estilos más difundidos del grupo *Lager* son Pilsen, Draft, Ice, Märzen, Bock y Rauch (**González, 2017**).

d. Cervezas tipo sour: Las cervezas ácidas o *sour beers* son estilos que se elaboran mayoritariamente de forma artesanal, y su producción se ha incrementado en los últimos años (**Dysvik y col., 2019**). En el presente trabajo el término “cerveza ácida o *sour*” hará referencia a una cerveza acidificada por medio de lactobacilos específicos. Cabe esta aclaración debido a que no deben ser confundidas con otras cervezas ácidas que se acidifican mediante otro mecanismo, como pueden ser aquellas con fermentaciones espontáneas o alternativas, inoculadas con levaduras “salvajes” o acidificadas completamente mediante la adición de frutas o añejadas en barricas. Como se comentó anteriormente, en este trabajo se elaboró una cerveza ácida tipo *sour* mediante una fermentación láctica controlada con bacterias lácticas específicas (**Parra**

Huertas, 2010). Esta fermentación láctica es realizada antes de la fermentación alcohólica, y es la responsable de la acumulación de ácido láctico y el descenso del pH. Como resultado, estas cervezas *sour* poseen un pH inferior a las cervezas convencionales, en torno a 3,5 en contraposición a valores de 4,5 para las cervezas convencionales (**Horincar y col., 2020**). En general las cervezas *sour* contienen trigo en su composición y se utiliza relativamente poco lúpulo en su elaboración. Esto hace que además de su elevada acidez, presenten un bajo amargor. Debido a que la fermentación ácida previa consume parte del sustrato fermentable, las cervezas *sour* se caracterizan también por un bajo contenido alcohólico. Todos estos atributos les confieren características refrescantes a las *sour*. Las cervezas estilo *European Sour Ale* como las belgas *Lambic* y *Flander* y la alemana *Berliner Weisse* son ejemplos clásicos de este estilo de cerveza, cuya producción se ha incrementado en los últimos años (**Dysvik y col., 2019**). La *Berliner Weiss* fue la cerveza base utilizada en este trabajo. La misma es una especialidad regional de Berlín que se clasifica dentro de las cervezas *sour*. Este estilo contiene entre un 50-65 % de malta de trigo que se completa con malta Pilsen y se fermenta con bacterias lácticas y levaduras *Ale*. Una descripción detallada de los pasos en la elaboración de una cerveza *sour* puede encontrarse en la *sección 2.2* de materiales y métodos.

1.1.4. Mercado internacional de cerveza

a. Producción y consumo mundial: La elaboración de cerveza es una industria importante, su expansión y crecimiento ha sido acompañada de sucesos tales como la invención de los ferrocarriles, el descubrimiento de la máquina de vapor, equipos de refrigeración y la domesticación y selección de las levaduras (**Kunze, 2006**). Es de destacar en las últimas décadas el crecimiento en la producción de los países de Europa Oriental, América Latina, Sudáfrica y algunos países de Asia y Oceanía. Sin embargo, el mayor incremento tuvo lugar en China.

La producción mundial de cerveza ronda los 190×10^6 KI por año. Los principales países productores son China, EEUU, Brasil, México, Alemania y Rusia (**Kirin, 2019**). Mientras que Argentina se encuentra en el puesto 23 a nivel mundial de productores con aproximadamente 2×10^6 KI por año (**Tabla 1**).

TABLA 1: Producción de cerveza a nivel mundial (artesanal + industrial) y posición relativa de la producción argentina (**Kirin, 2019**).

Ranking	País	Producción (Millones de KI por año)
1	China	39
2	EEUU	22
3	Brasil	14
4	México	12
5	Alemania	9
6	Rusia	8
23	<i>Argentina</i>	2
<i>Total mundo</i>		<i>190</i>

En cuanto al consumo, la cerveza actualmente ocupa el quinto lugar (compartido con los jugos) como bebida en general (**Yeo y Liu, 2014**) y el segundo lugar después de los licores o bebidas blancas, como bebida alcohólica más consumida en todo el mundo (**OPS, 2018**). Los países europeos lideran el ranking de consumo per cápita anual encabezados por República Checa con 192 L, Austria con 108 L y Alemania con 101 L. Si consideramos el consumo interno total por país, lideran China, seguido de EEUU y Brasil (**Kirin, 2019**).

b. Cervezas artesanales: En lo que refiere a la producción y consumo de cerveza artesanal a nivel mundial, ambos han experimentado un aumento significativo en los últimos años (**Aquilani y col., 2015**). Estados Unidos es un ejemplo de este incremento,

en donde actualmente la cerveza artesanal participa con el 15 % del mercado total de la cerveza producida en ese país (**Brewers Association, 2020**). Muchos autores adjudican este incremento a la variedad, la ausencia de aditivos de síntesis y la complejidad de sabores y aromas que ofrecen las cervezas artesanales, haciéndolas muy demandadas por los consumidores (**Factoría de cerveza, 2019**).

1.1.5. El mercado argentino de cerveza

a. Consumo: En Argentina la cerveza viene mostrándose como la bebida fermentada preferida desde hace varios años, liderando el mercado de bebidas alcohólicas con un consumo per cápita superior al de otras bebidas. De hecho, entre 2001 y 2003 se consumían en el país prácticamente la misma cantidad de litros de cerveza que de vino, mientras que en 2012 la relación cambió a razón de 1 L de vino por 1,9 L de cerveza (**Ablin, 2014**). El consumo per cápita anual se ubica en 45 L, valor por debajo del promedio latinoamericano que se ubica en 60 L. Situación que podría interpretarse como una posibilidad de crecimiento para esta industria en el país (**Berlingeri, 2019**).

b. Relevancia para la agroindustria nacional: Para Argentina, la cerveza es una importante agroindustria con insumos y mano de obra nacionales. El 99 % de la cerveza que se consume en nuestro país es producida con materias primas locales. Además, Argentina se posiciona como el principal proveedor de cebada y malta a los países sudamericanos, lo cual significa que los mercados de la región consumen cerveza elaborada principalmente con cebada cultivada en el país. Esto es relevante en cuanto a la generación de ganancias para la economía nacional, si se considera la importancia de Brasil en la producción y consumo de cerveza, como se indicó en la sección *1.1.4a* (**Sommantico, 2019**).

c. Cervezas artesanales en Argentina: El rubro artesanal, actualmente consta con 80 empresas y 1.500 cervecerías distribuidas en todo el país. Abarca cientos de emprendimientos en todo el país generando unos 6.500 puestos de trabajo directos en

las fábricas, y otros tantos indirectos en bares, restaurantes, fabricantes de equipos y proveedores de insumos y servicios. Representa el 3 % del mercado total de cerveza (**Gonzalez- Insfram, 2019**). La cerveza artesanal es muy relevante en ciudades como Bariloche, El Bolsón, Mar del Plata, Córdoba y La Plata.

El crecimiento acelerado del sector en los últimos años (20-35 %), sumado a la creciente exigencia de calidad por parte de los consumidores, ha obligado a los elaboradores a multiplicar sus esfuerzos por mejorar sus productos y diversificarlos para mantenerse en el mercado (**Libkind y Bruzone, 2018**). Además, los consumidores están cada vez más dispuestos a conocer sobre las distintas variedades, factor que incide al momento de la compra, donde el precio ya no es el único elemento de la ecuación, y se tienen muy en cuenta aspectos como el sabor y la composición de la cerveza (**Tonsmeire, 2014**). Por lo tanto, crece la demanda de materias primas naturales no convencionales para elaborar cervezas diferenciadas. Muchos frutos exóticos, entre los que se encuentra el calafate, surgen como una buena posibilidad, no solo para elaborar productos con diferentes características organolépticas, sino también productos con mayor contenido de antioxidantes.

1.1.6. Propiedades nutricionales de la cerveza

a. Composición: La cerveza es una bebida con más del 90 % de agua. Es relativamente baja en calorías, dado que una porción de 350 mL aporta solo entre 7-8 % de la energía de una dieta de 2.000 Kcal (**De Gaetano y col., 2016**). Si bien la cerveza no posee niveles significativos de azúcares simples, si se encuentran carbohidratos de mayor peso molecular. Las proteínas están en torno al 0,5 %, mientras que su contenido en lípidos, colesterol o fibra no es significativo (**Tabla 2**).

TABLA 2: Composición nutricional de una cerveza tipo Pilsen (De Gaetano y col., 2016).

Componente	Unidad	Contenido medio	
		Litro	Porción (350 mL)
Agua	g	920	322
Energía	kcal	430	151
Proteínas	g	4,6	1,6
Lípidos	g	0	0
Carbohidratos	g	35,5	12,4
<i>Minerales</i>			
Calcio, Ca	mg	40	14
Hierro, Fe	mg	0,2	0,07
Magnesio, Mg	mg	60	21
Fosforo, P	mg	140	49
Potasio, K	mg	270	94,5
Sodio, Na	mg	40	14
Zinc, Zn	mg	0,10	0,04
Cobre, Cu	mg	0,05	0,02
Selenio, Se	µg	6	2,1
Flúor, F	µg	442	155
<i>Vitaminas</i>			
Tiamina	mg	0,05	0,02
Riboflavina, B2	mg	0,25	0,09
Niacina	mg	5,13	1,80
Piridoxina, B6	mg	0,46	0,16
Folato	µg	60	21
Colina	mg	101	35,4
Cobalamina, B12	µg	0,20	0,07
<i>Aminoácidos</i>			
Alanina	g	0,12	0,04
Ácido aspártico	g	0,16	0,06
Ácido glutámico	g	0,47	0,16
Glicina	g	0,13	0,05
Prolina	g	0,35	0,12
Alcohol, etílico	g	39	13,7

En cuanto a los minerales, es de destacar el aporte de fluoruro y en menor medida selenio, dado que una porción de esta bebida aporta el 10 y 5 % de la ingesta recomendada de estos micronutrientes, respectivamente. La cerveza aporta otros

específicamente los compuestos fenólicos, pueden jugar un rol muy importante en la prevención de ciertas enfermedades (Nova y col., 2018). La cerveza es fuente de antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, con un contenido un poco inferior al del vino (Radonjić y col., 2020). Ambas bebidas contienen ácidos fenólicos y flavonoides. En el caso de la cerveza, la malta y el lúpulo aportan ácidos fenólicos, flavan-3-oles, flavonoles y proantocianinas, mientras que la uva confiere altos niveles de antocianinas y resveratrol o altos niveles de resveratrol en el caso de que el producto final sea vino tinto o blanco, respectivamente (Kaplan y col., 2000) (Anexo).

TABLA 3: Composición en fenoles de una cerveza tipo Pilsen (Piazzon y col., 2010; De Gaetano y col., 2016).

Componente	Unidad	Contenido medio	
		Litro	Porción (350 mL)
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ferúlico	mg	16,6	5,8
Sináptico	mg	3,4	1,2
<i>p</i> -cumárico	mg	1,4	0,5
Otros	mg	5,3	1,9
<i>Flavonoides</i>			
<i>Flavan-3-oles</i>			
Catequina	mg	3,8	1,3
Epicatequina	mg	0,8	0,3
Galocatequina	mg	0,7	0,2
<i>Flavonoles</i>			
Kaempferol	mg	8,1	2,8
Miricetina	mg	0,2	0,1
<i>Proantocianidinas</i>			
Monómeros	mg	6,3	2,2
2-6 unidades	mg	14	4,9

En general, aunque esto puede variar de acuerdo a la receta, un 80 % de los fenoles de la cerveza derivan de la malta y el restante 20 % del lúpulo (Jurková y col., 2012). El poder antioxidante del mosto se ha correlacionado con el contenido en catequina y epicatequina liberados durante el malteado (Krofta y col., 2008) (Tabla 3). Sin

embargo, un gran porcentaje del poder antioxidante original de la materia prima se pierde durante la etapa de fermentación y parte de los fenoles son absorbidos en los sólidos del mosto (**Jurková y col., 2012**).

1.1.7. Incorporación de vegetales a cerveza (cervezas con fruta)

Muchos cerveceros, en especial los cerveceros artesanales, sienten la necesidad de experimentar con nuevos ingredientes en sus formulaciones. Este hecho sumado al reciente auge de la cervecería artesanal ha conducido a un “proceso social de innovación” en la industria de la cerveza artesanal (**Forde, 2017**). La utilización de materias primas que no sean la malta, lúpulo, levadura o agua ha sido la práctica más común para obtener nuevas formulaciones. Los cerveceros han recurrido al uso de frutas, especias, flores y hasta verduras con este propósito (**Strong y England, 2015**). En el caso de las frutas, si bien pueden incorporarse a cualquier estilo de cerveza, generalmente los cerveceros optan por incorporarlas dentro de las formulaciones de cervezas estilo *sour*. Esto se explica por el hecho de que este estilo provoca que el sabor de la fruta se sienta más natural, hecho que parece lógico debido al carácter ácido de muchas frutas (**Tonsmeire, 2014**). También hay que considerar que las frutas pueden ser una buena fuente de compuestos reconocidos por sus efectos favorables para la salud (**Jin y col., 2014; Martínez y col., 2017a**). De este modo la incorporación de fruta a la cerveza puede incrementar su contenido de compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante dando como resultado un producto con mayor valor agregado. Además, los antioxidantes se han correlacionado con una mayor estabilidad oxidativa y organoléptica de la cerveza durante el almacenamiento (**Caballero y Porras, 2012**). Si bien algunos trabajos han evaluado el efecto de la incorporación de frutas (**Martínez y col., 2017a; Kawa-Rygielska y col., 2019**) y vegetales (**Horincar y col., 2020**) en las características fisicoquímicas y capacidad antioxidante de cerveza, llamativamente pocos estudios científicos han evaluado los efectos de la incorporación de fruta en cervezas estilo *sour*.

1.2. Características generales del fruto de calafate

1.2.1. Características de la planta y el fruto de calafate

a. La planta: La planta de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) es un arbusto espinoso, perenne, de la familia *Berberidaceae*, que puede llegar a medir hasta tres metros de altura. Posee grandes espinas y sus flores se encuentran solitarias o agrupadas en inflorescencias de dos o tres flores, con seis pétalos y seis sépalos de color amarillo (**Figura 7**). Crece espontáneamente en diversas condiciones ambientales, desde el clima árido y semiárido frío típico de la zona extra andina, hasta los climas subpolares oceánicos característico de la Patagonia andina (**Arena, 2018**). El calafate se encuentra distribuido de forma silvestre en un amplio territorio que abarca la zona andino-patagónica de Argentina y Chile. En Argentina puede encontrarse desde Neuquén hasta Tierra del Fuego. Estos arbustos sirven de forraje para los rumiantes, quienes consumen sus flores, frutos y brotes tiernos. También cumplen un rol fundamental en el ecosistema, actuando como refugio de varias especies animales y previniendo procesos erosivos (**Bottini y col., 1993**).



Figura 7: Flores de calafate (izquierda) y frutos en la planta (derecha).

b. Los frutos: Los frutos del calafate son bayas subglobosas de 0,7 a 1,1 cm de diámetro (**Figura 8**) que pesan aproximadamente 400 mg. Los frutos viran del color verde en su estado inmaduro al azul oscuro-violáceo cuando maduran, contienen de 6 a 10 semillas negras oscuras a marrones, con un promedio de 9,9 semillas por fruto (**Arena y Curvetto, 2008**). Las semillas pueden representar valores en torno al 35 % del peso del fruto en base seca. Las semillas también ocupan gran parte del volumen

del fruto en sí. La fruta comercializada proviene de plantas en estado silvestre, que crecen y se diseminan de manera natural (**Arena y col., 2013**).



Figura 8: Frutos de calafate cosechados.

1.2.2. Manejo del fruto de calafate

a. Cosecha: El criterio de cosecha de los frutos se basa normalmente en el color superficial de las bayas; la calidad de los frutos se evalúa a través del aspecto externo (color, tamaño, forma, ausencia de defectos), la firmeza y su sabor. Los frutos deben cosecharse cuando alcanzaron la madurez de consumo ya que no pueden madurar fuera de la planta. En la literatura se ha informado que, al momento de cosecha, el contenido de sólidos solubles ronda 20 ° Brix, aunque estos niveles son muy variables por estar supeditados a las condiciones climáticas (**Moghaddam y col., 2013**). Los frutos maduros presentan una elevada acidez comparada con otras especies frutales, predominando el ácido málico con 3-3,4 % mientras que el pH de los frutos es de 3-3,4 (**Arena y Curvetto, 2008**).

b. Poscosecha: Los frutos una vez cosechados son altamente perecederos, presentan una tasa respiratoria elevada ($40 \text{ mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) y una baja a moderada producción de etileno (cerca de $1\text{-}2 \text{ } \mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Al igual que la mayor parte de los *berries*, el calafate tiene un comportamiento no climatérico. La capacidad de almacenamiento del calafate es muy limitada debido al ablandamiento de los frutos y la incidencia de enfermedades de poscosecha. El cambio de color de las bayas como consecuencia de la pérdida de compartimentalización celular en la pulpa fue descrito como el principal factor de deterioro en ensayos de almacenamiento (**Rodoni y col., 2014**). La temperatura de almacenamiento de $0 \text{ }^\circ\text{C}$ es la más adecuada, y la vida poscosecha en estas condiciones es de 2 a 3 semanas.

c. Estabilización de los frutos: Los frutos de calafate tienen una limitada vida útil en su forma fresca. El procesamiento de estos frutos aparece como una estrategia de interés para reducir estas mermas, agregar valor y aumentar la oferta tanto geográfica como estacional. Una forma de procesamiento posible para estos frutos es el secado, mediante el cual se remueve el agua del producto reduciendo la actividad acuosa a valores de estabilidad, generalmente inferiores a 0,7 (De Michelis y Ohaco, 2015). Entre los diferentes tipos de secado, la liofilización es especialmente efectiva en remover el agua de los alimentos casi sin afectar los componentes del *flavor* y nutricionales que sean sensibles al calor. Lo anterior es posible porque el alimento se congela y luego se somete a una atmósfera de baja presión, por lo cual el agua sublima y es eliminada sin la necesidad de someterlo a elevadas temperaturas (Parzanese, 2012). En este trabajo se utilizaron frutos de calafate liofilizados (Figura 9).



Figura 9: Frutos de calafate secados por liofilización.

1.2.3. Características nutricionales del calafate

a. Composición del calafate: La información bibliográfica sobre la composición de los frutos de calafate es variable. Dicha variabilidad puede estar ligada al crecimiento en forma silvestre de esta planta, que ocurre en un muy amplio territorio con diferencias marcadas en clima y condiciones del terreno. Sumado a esto, la cosecha de este fruto no está bien definida, y el momento de cosecha puede tener un efecto muy marcado en el contenido de nutrientes. El fruto puede ser cosechado por color ya a los 84 días después de la floración. Aunque algunos trabajos indican que los niveles de acidez y

azúcares mínimos y máximos, respectivamente, se alcanzan luego de los 105 d, por lo que debería transcurrir ese tiempo para cosecharlos (**Arena y Curvetto, 2008**). Otros factores analíticos tales como considerar o no las semillas en el momento del análisis también puede ocasionar grandes variaciones. Algunos componentes nutricionales del calafate se muestran en la **Tabla 4**. Los frutos tienen entre 70-80 % de agua mientras que los azúcares pueden variar entre 5-11 %. El contenido de fibra de este fruto es elevado, debido principalmente al aporte de las semillas y cáscara que ocupan un gran volumen y peso del fruto. El nivel de proteína se ubica en torno a 2,6 %. Los frutos incluso en estado de madurez avanzado son de gusto ácido, ya que los mismos poseen un nivel de ácidos totales que alcanza el 1,1 % (**Arena y col., 2013**).

b. Propiedades antioxidantes y antocianinas del calafate: Los frutos de calafate se encuentran entre los de mayor poder antioxidante conocido. Por ejemplo, el arándano, que es considerado una buena fuente de antioxidantes, posee sólo un cuarto del poder antioxidante del calafate. En la **Tabla 4** se indica un valor de referencia de la capacidad antioxidante por el método de Folin para frutos de calafate. Si bien se han reportado en calafate cantidades desde moderadas a altas de vitamina C (entre 25-75 mg cada 100 g), la capacidad antioxidante de estos frutos está determinada principalmente por su nivel de compuestos fenólicos (**Rodoni y col., 2014**). Esto es similar en arándano, uva, frambuesa, zarzamora, entre otros *berries*, también ricos en compuestos fenólicos. Los tipos de fenoles en *berries* corresponden principalmente a ácidos fenólicos, flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavan-3-oles), proantocianidinas y estilbenoides (resveratrol en uva por ejemplo) (**Anexo**) (**Muñoz-Jauregui, 2007**). En el caso de calafate se han informado niveles de ácidos fenólicos en torno a 130 mg cada 100 g. Entre los flavonoides se destaca por su elevado nivel de antocianinas, entre 0,4-1,2 %, mientras que otros flavonoides son minoritarios (**Arena y col., 2012**). Igualmente hay trabajos que han detectado concentraciones 20 veces superiores de flavan-3-oles que las indicadas en la **Tabla 4** (**Ruiz y col., 2010**). Más allá de esto, las antocianinas son los fenoles mayoritarios en los frutos de calafate.

TABLA 4: Composición de los frutos del calafate (**Arena y Curvetto, 2008; Ruiz y col., 2010; Arena y col., 2012; Arena y col., 2013**).

Componente	Unidad	Contenido (100 g peso fresco)
Agua	g	70-80
Azúcares	g	5-11
Fibra	g	7-17
Proteína	g	2,6
Ác orgánicos totales	g	1,1
Ác ascórbico	mg	25-74
Ácidos Fenólicos	mg	130
<i>Flavonoides</i>		
Flavan-3-oles (Eq catequina)	mg	7
Flavonoles (Eq. quercetina)	mg	5
Antocianinas (Eq delphinidina-3-glucosido)	mg	420-1.200
Poder antioxidante por Folin (Eq ácido gálico)	mg	900

Químicamente las antocianinas son glucósidos hidrosolubles formados por una estructura fenólica (antocianidina) y uno o más azúcares unidos covalentemente. Las antocianinas se hallan en las vacuolas celulares de vegetales y otorgan el color característico a muchas hojas, flores y frutos. Entre sus funciones podemos nombrar la atracción de insectos polinizadores, atracción de animales diseminadores de semillas y la protección contra la radiación UV. El color de las antocianinas puede variar considerablemente desde azul-violeta a rojo-naranja-rosado. El color de una solución pura de una antocianina depende de la parte fenólica de la molécula (antocianidina). En la naturaleza es común encontrar mezclas de antocianinas en cuyo caso el color es determinado por las proporciones relativas y la sumatoria de la absorción de las longitudes de onda específicas de las antocianinas individuales. Si bien el calafate posee una mezcla compleja de antocianinas, mayoritariamente son mono-glicosiladas, representadas por delphinidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y malvidina-3-

glucósido, aunque también posee cantidades inferiores de di-glicosidas (**Ruiz y col., 2010**).

1.2.4. El calafate en la industria alimenticia

a. Antecedentes: El calafate está presente en la cultura de los pueblos originarios. Los Pueblos Tehuelches preparan una bebida a base de una maceración en agua de los frutos triturados, pero sin dejarlos fermentar. Los pueblos Mapuches, por su lado, utilizan los frutos para elaborar bebidas fermentadas (**Alonso y Desmarchelier, 2006**). En nuestro país, el calafate ha sido incorporado en el 2006 al Código Alimentario Argentino por Resolución Conjunta 22/2006 y 409/2006, autorizándose su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados, confites y bebidas sin alcohol. El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile lleva a cabo un programa de domesticación del calafate con el objetivo de seleccionar los mejores ecotipos para ser incorporados en productos alimenticios (**Rivera, 2018**). Actualmente, es habitual encontrar productos a base de calafate en la región patagónica argentina tales como infusiones, confituras y fruto deshidratado, donde es consumido por pobladores locales y turistas (**Arena y col., 2013**).



Figura 10: Productos a base de calafate

b. Potencialidades: La creciente preocupación de los consumidores por el incremento en el uso de aditivos de síntesis en la formulación de alimentos ha conducido a un mayor interés en la búsqueda de aditivos naturales. Esto incluye los colorantes

naturales de origen vegetal, capaces de impartir color a diferentes matrices alimenticias. El alto nivel de antocianinas convierte al fruto de calafate en un buen candidato para ser utilizado como ingrediente en la industria alimenticia. Las antocianinas poseen la ventaja de una elevada solubilidad en agua y capacidad colorante. Además, las antocianinas pueden incrementar el valor agregado de los alimentos por sus propiedades antioxidantes y sus efectos benéficos para la salud (**Giusti y Wrolstad, 2003; Jin y col., 2014**). Sin embargo, la utilización de antocianinas se ha encontrado con algunas limitaciones tales como su baja estabilidad en algunas matrices en comparación a los aditivos sintéticos (**Ertan y col., 2020**). Tanto la estabilidad como la capacidad colorante de las antocianinas dependen del pH del medio en la que se encuentran, y estas dos características se maximizan cuando el pH del medio desciende por debajo de 3,5 (**West y Mauer y col., 2013**). Esto conduce a que en muchas matrices alimenticias no se pueda aprovechar al máximo las características de las antocianinas. Un ejemplo es el caso del yogurt que posee un pH en torno a 4,5 (**Giusti y Wrolstad, 2003**).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de la incorporación de frutos de calafate en cerveza. Se diseñó una cerveza estilo sour con diferentes niveles de calafate adicionado. Se estudió el efecto de la incorporación del fruto sobre la capacidad antioxidante y las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza. También se evaluó la estabilidad durante el almacenamiento de las cervezas con calafate.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizaron frutos de calafate (*Berberis microphylla*) cosechados de una población silvestre localizada en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, 54° 48 S, 68° 19W, Tierra del Fuego, Argentina, a principios del 2019. Se seleccionaron frutos sanos libres de defectos o enfermedades. Los frutos se refrigeraron y transportaron al laboratorio en donde se lavaron con hipoclorito de sodio (150 mg kg⁻¹, pH 6,5 por 1 min), se enjuagaron tres veces con agua potable, se congelaron en N₂ líquido, se molieron en un molinillo y se conservaron a -80 °C. Los frutos frescos tuvieron 20 °Brix, un pH de 3,4, acidez de 17 g kg⁻¹ como equivalentes de ácido málico y un contenido de agua en base fresca de 720 g kg⁻¹. El fruto triturado fue liofilizado (RIFICOR, Argentina) a 35 °C y 2,13 mbar por 48 h y almacenado a -20 °C hasta su utilización. La materia seca de las muestras secadas se determinó por secado a 105 °C en estufa de vacío hasta peso constante. El contenido de humedad del producto final fue de 170 g H₂O kg⁻¹ de peso fresco. En los experimentos se utilizaron frutos liofilizados.

2.2. Elaboración de cerveza

Se utilizó como cerveza base una *Berliner Weisse* la cual es una cerveza tipo *sour*. Las elaboraciones se realizaron en la cervecería artesanal LAURUS®, La Plata, Argentina. Se molieron unos 10 kg de una mezcla de maltas de 50 % cebada Pilsner (Sacha Maltería Platense, Argentina) y 50 % trigo (Maltear, Argentina). El agua para la maceración se filtró por osmosis inversa (Romin Ingeniería, Serie Riepro 800, Argentina) y luego a 55 L de esa agua se adicionaron 0,054 g L⁻¹ de CaCl₂, 0,018 g L⁻¹ de CaSO₄, 0,013 g L⁻¹ de CaCO₃, 0,013 g L⁻¹ de MgSO₄ y 0,27 g L⁻¹ de H₃PO₄. La maceración fue a 67 °C por 90 min, ajustando el pH a 5,5 y obteniendo una densidad final de 1.048 g L⁻¹. Para remover el azúcar residual el grano se lavó con 25 L de agua de osmosis a 78 °C. El mosto fue hervido a 100 °C por 15 min para eliminar la microflora y se enfrió rápidamente a 35 °C. Para la fermentación láctica se utilizó un cultivo de *Lactobacillus*

plantarum “Sour Pitch” (Wild Brew-Lallemand, Canadá). El cultivo se hidrató con agua de osmosis a 25 °C y se adicionó al mosto a una temperatura de 35 °C. El pH inicial fue de 5,4 y descendió a 3,4 luego de 24 h de incubación. En la cocción el mosto fue hervido por 60 min y 15 min antes del fin del hervor se adicionaron 30 g de pellet de lúpulo (Crystal variety, United States) y nutrientes para levadura (Servomyces, Lallemand Brewing, Canadá). Se llegó a una densidad de 1.037 g L⁻¹. Luego de la cocción se realizó el *whirlpool*. El mosto fue enfriado rápidamente a 18 °C, se colocó en fermentadores y se inoculó con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Ale Nottingham, Lallemand, Canadá) en una proporción de 0,8 g L⁻¹ luego de su activación en agua estéril a 25 °C por 30 min. La fermentación se realizó por 9 días a 17 °C. La **Figura 11** indica los pasos de la elaboración de forma esquemática.

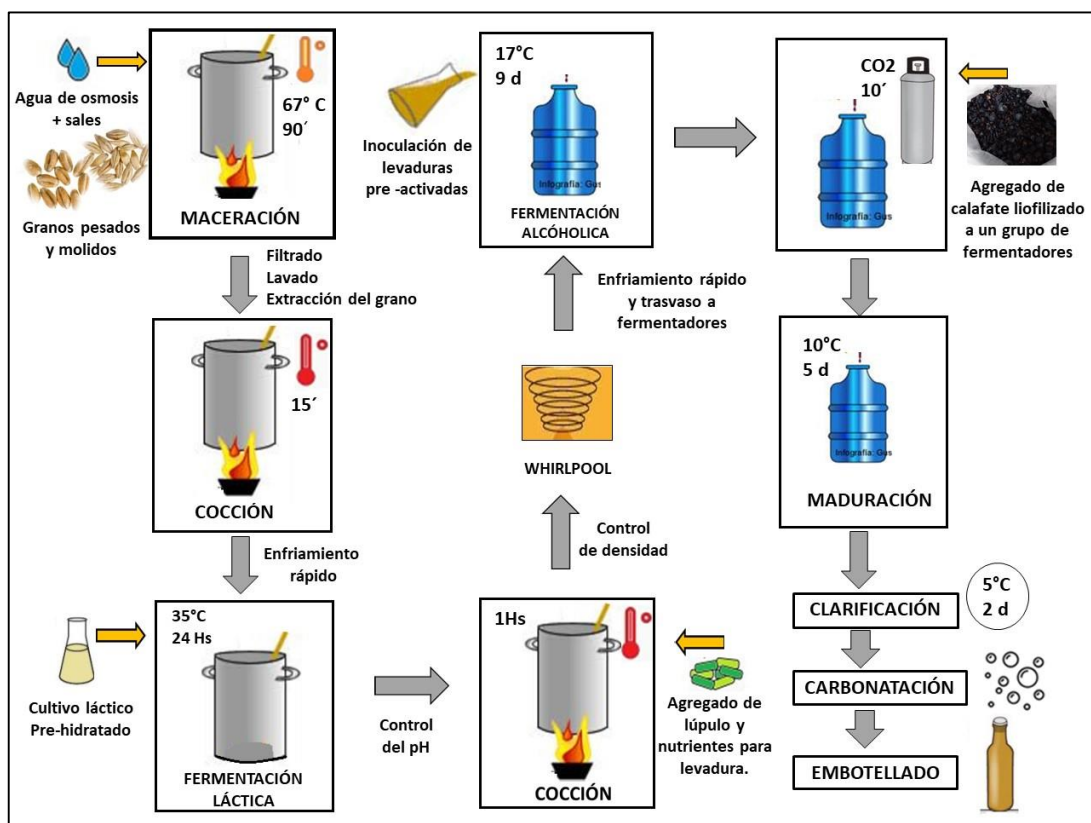


Figura 11: Diagrama de flujo de la elaboración de la cerveza realizada

2.3. Adición de calafate

Luego de la fermentación alcohólica (densidad 1.010 g L⁻¹) y con el objetivo de elaborar cervezas *sour* con diferentes niveles de fruta, la cerveza fue dividida en 12

volúmenes de 3,5 L cada uno en fermentadores de 5 L. Cada fermentador fue adicionado con 0 (control); 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado. Se burbujeó CO₂ por 10 min para favorecer la extracción de los componentes del fruto sin favorecer la oxidación. La cerveza se mantuvo 5 días a 10 °C y subsecuentemente se clarificó a 5 °C por 2 d. Se realizaron tres replicados de 3,5 L para cada nivel de fruta adicionada. Luego de la clarificación la cerveza fue carbonatada con CO₂, embotellada bajo presión en botellas de 340 mL color caramelo. Luego de 2 días a 5 °C, las muestras fueron evaluadas.

2.4. Almacenamiento de la cerveza

Se elaboró una cerveza *sour* con agregado de 5 g L⁻¹ como se mencionó anteriormente. En este caso se realizaron seis fermentaciones independientes (3 fermentadores controles y 3 fermentadores para la adición de calafate). El producto embotellado en botellas de 350 mL color caramelo se almacenó a 5 °C en oscuridad por 0, 30, 60 y 90 d. En cada uno de estos tiempos de muestreo se evaluaron propiedades antioxidantes, características fisicoquímicas y sensoriales tal y como se describe adelante.

2.5. Análisis de calidad

2.5.1. Desgasificación de las muestras

Para las determinaciones de color, fenoles totales, antocianinas, % de ionización, pardeamiento y polimerización, y la capacidad antioxidante las muestras se congelaron y conservaron a -20 °C. Para su utilización muestras se descongelaron y se agitaron en vórtex por 10 min para remover el CO₂ remanente.

2.5.2. Color EBC, color rojo y densidad de color

Un mililitro de cerveza desgasificada se colocó en una cubeta de 1 cm de espesor. La muestra se analizó espectrofotométricamente (Model 721, Numak). Se

registraron las absorbancias a 420, 430, 520 and 700 nm utilizando agua destilada como referencia. El color EBC (European Brewery Convention), color rojo y la densidad del color se calcularon como:

$$\text{Color EBC} = (\text{Abs}_{430} - \text{Abs}_{700}) \times 25$$

$$\text{Color rojo} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})$$

$$\text{Densidad de color} = (\text{Abs}_{420} - \text{Abs}_{700}) + (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})$$

Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.3. Color CIELab

El color de la cerveza se determinó con un colorímetro (Minolta, Model CR-300, Osaka, Japan) equipado con un cabezal sumergible. Diez mililitros de muestra desgasificada se colocaron en una cubeta cilíndrica opaca de 2 cm de alto y 2 cm de diámetro donde el cabezal del colorímetro fue sumergido para la medición. Se registraron los parámetros CIELab de color (L^* , a^* y b^*). Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.4. pH, acidez y densidad

Una alícuota de 10 mL de muestra se llevó a 100 mL con agua destilada. El pH se midió con un pHmetro (Numak, PHS-3E). Para la acidez las muestras se titularon con NaOH 0,1 mol L⁻¹ hasta pH= 8,2 (**AOAC, 2012**). La acidez se expresó en miliequivalentes de [H⁺] por litro. La densidad se determinó con un densímetro y se expresó en g L⁻¹. Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.5. Antocianinas

Las antocianinas totales se estimaron por el método de diferencial de pH (**Giusti y Wrolstad, 2003**). Las muestras desgasificadas se diluyeron apropiadamente con

buffer KCl (0,025 mol L⁻¹, pH: 1) o con buffer acetato de sodio (0,4 mol L⁻¹, pH: 4.5). Se midió la absorbancia de ambas soluciones a 520 y 700 nm en una cubeta de 1 cm de espesor. El contenido de antocianinas se calculó según el coeficiente de absorción de la delphinidina-3-glucosido, $\epsilon = 0,051 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como mg de delphinidina-3-glucosido (mg D3G L⁻¹):

$$\text{mg D3G L}^{-1} = [A \times FD - B \times FD] \times \epsilon^{-1} \times 1 \text{ cm}^{-1}$$

Donde:

A: ($\text{Abs}_{520; \text{pH}:1} - \text{Abs}_{700; \text{pH}:1}$)

B: ($\text{Abs}_{520; \text{pH}:4,5} - \text{Abs}_{700; \text{pH}:4,5}$)

FD: factor de dilución.

Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.6. Ionización, color polimérico e índice de pardeamiento

Se midió la absorbancia a 520 nm de una alícuota de cerveza desgasificada. Una segunda alícuota se diluyó con buffer KCl a pH < 1, y la absorbancia a 520 nm de esta segunda alícuota fue medida. La proporción de antocianinas en su forma de ion flavilio se estimó como la relación entre las absorbancias al pH de la cerveza y a pH < 1. El resultado se expresó como % de antocianinas ionizadas:

$$\% \text{ de antocianinas ionizadas} = 100 \times A \times (B \times FD)^{-1}$$

Donde:

A: ($\text{Abs}_{520; \text{pH of beer}} - \text{Abs}_{700; \text{pH of beer}}$)

B: ($\text{Abs}_{520; \text{pH}<1} - \text{Abs}_{700; \text{pH}<1}$)

FD: factor de dilución

Los productos provenientes de la degradación de las antocianinas se estimaron midiendo el color polimérico. Las muestras desgasificadas se diluyeron con agua destilada. A una alícuota de 2,8 mL se le adicionó 0,2 mL de K₂S₂O₅ (20 % p/v, recién

preparado). Se agito en vórtex y luego de 15 min se midieron las absorbancias a 420 y 520 nm. El índice de polimerización (IP) se calculó como:

$$IP = (Abs_{420} \times FD + Abs_{520} \times FD)$$

Donde FD es el factor de dilución.

El pardeamiento se determinó como el cociente de las absorbancias a 430 y 520 nm desde una alícuota de cerveza desgasificada y expresado como índice de pardeamiento (IB):

$$IB = (Abs_{430} / Abs_{520})$$

Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.7. TEAC

Se realizó de acuerdo con **Arnao y col., (2001)**. Unos 100 µL de una dilución adecuada de cerveza se mezcló con 1 mL de solución de ABTS^{•+} y se homogenizó en vórtex. Se midió la absorbancia a 734 nm luego de 6 min. Se utilizó Trolox como estándar y los resultados se expresaron como equivalente de Trolox (mg TE L⁻¹). Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.8. Fenoles

Los fenoles totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (**Singleton y col., 1999**). La mezcla de reacción contenía 50 µL de cerveza, 950 µL de agua destilada, 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada 1: 1 y 100 µL de carbonato de sodio al 20 % en 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. Luego de 90 min de incubación a 25 °C, se registró la absorbancia a 760 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg GAE L⁻¹). Se realizaron tres repeticiones analíticas por cada uno de los tres replicados y se promediaron.

2.5.9. *Análisis sensorial*

Las cervezas con diferente nivel de calafate (2,5; 5 y 10 g L⁻¹) fueron analizadas por cuatro jueces entrenados de la Beer Judge Certification Program (BJCP). Los jueces evaluaron en una escala hedónica de 10 puntos la impresión general, apariencia, aroma, *flavor*, acidez y balance.

En otra instancia los jueces también evaluaron la cerveza control (sin calafate) y enriquecida con calafate (5 g L⁻¹) luego de 0 y 90 días de almacenamiento. Para evaluar la aceptabilidad de las cervezas con calafate, se realizó un test de aceptabilidad de consumidores. Los consumidores (n=64 con un rango de 20-50 años e igual proporción entre hombres y mujeres) evaluaron la cerveza control (sin calafate) y enriquecida con calafate (5 g L⁻¹) utilizando una escala hedónica de 9 puntos. A los panelistas se les ofreció 75 mL de cerveza a 5 °C en un vaso de plástico cristal descartable de 100 mL en donde evaluaron la aceptabilidad general, color, aroma y sabor.

2.5.10. *Análisis estadístico*

Se utilizó un diseño factorial. En el caso de las cervezas con diferente cantidad de calafate, el factor fue la cantidad de fruta adicionada (1 factor de 4 niveles). En el caso del ensayo de almacenamiento, los factores fueron el nivel de fruta y el tiempo de almacenamiento (un factor con dos niveles y un factor con cuatro niveles). Excepto en los análisis sensoriales, la unidad estadística utilizada fue la cerveza de cada fermentador ($n= 3$). Se muestran las medias de los tres replicados \pm el error estándar. En el caso de los análisis sensoriales, se utilizó la cerveza de un sólo fermentador y se muestra la media de los N evaluadores \pm el error estándar.

Las medias se compararon por ANOVA utilizando el test de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$. La fuerza de las correlaciones lineales entre variables se calculó mediante la correlación de Pearson.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

-Evaluar la factibilidad de obtener una cerveza artesanal con elevados niveles de compuestos antioxidantes y buenas propiedades organolépticas y de estabilidad a partir de la incorporación a la misma de frutos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) liofilizados.

Hipótesis: La incorporación de frutos de calafate liofilizados en la cerveza permite generar un producto con elevados niveles de antioxidantes, con buena aceptabilidad y estabilidad.

3.2. Objetivos Específicos

A-Evaluar el impacto del agregado de diferentes niveles de calafate sobre el contenido de antioxidantes y las características fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza.

Hipótesis A1: La incorporación de frutos de calafate a la cerveza incrementa su nivel de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en función de la cantidad de fruto utilizado.

Hipótesis A2: Se pueden obtener cervezas enriquecidas con calafate que tengan buenas características fisicoquímicas y sensoriales.

B-Monitorear la capacidad antioxidante de la cerveza con calafate durante el almacenamiento.

Hipótesis B: La capacidad antioxidante de la cerveza adicionada con calafate se mantiene estable durante el almacenamiento a 5 °C.

C-Determinar las características fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza con calafate durante el almacenamiento 5 °C.

Hipótesis C: Las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza con calafate se mantienen estables durante el almacenamiento a 5 °C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Influencia de la adición de calafate en las propiedades antioxidantes, fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza

4.1.1. Efecto de la adición de calafate en la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cerveza

El elevado nivel de antocianinas de los frutos del calafate lo convierten en un excelente candidato para el enriquecimiento de bebidas con antocianinas. Los contenidos de antocianinas en base al peso fresco de los frutos frescos y liofilizados fue de $11,0 \pm 0,1$ ($n=4$) y $30,0 \pm 1,1$ ($n=4$) g D3G kg^{-1} , respectivamente. Mientras que los contenidos de antocianinas en base al peso seco de los frutos frescos y liofilizados fue de $38,0 \pm 3,0$ ($n=4$) y $36,0 \pm 1,3$ ($n=4$) g D3G kg^{-1} , respectivamente. Estos valores son entre 10 y 15 veces más elevados que los encontrados en arándano y berenjena, respectivamente, dos vegetales que se consideran excelentes fuentes de estos compuestos (Skrede y col., 2000; Todaro y col., 2009). El nivel de antocianinas del calafate es comparable a otros llamados “súper frutos” tales como el maqui y arándano (Ruiz y col., 2010; Sadowska y col., 2017).

La incorporación de antocianinas permitió obtener cervezas con 30-100 mg D3G L^{-1} de antocianinas en correlación con el nivel de fruta adicionado ($R=0,997$; $p=0,000$) (Figura 12A). Similares concentraciones fueron alcanzadas con cáscara de berenjena deshidratada (Horincar y col., 2020). El cociente entre las antocianinas y los sólidos totales del calafate asciende a 40 g Kg^{-1} , un valor superior al de otros frutos tales como frambuesa, arándano o mora con valores de 4,2; 12 y 21, respectivamente (Skrede y col., 2000; Sadowska y col., 2017). Esto permitió incorporar altos niveles de antocianinas con relativamente poca cantidad de fruta.

Las cervezas contienen antioxidantes tales como ácidos fenólicos, flavonoides y pro-antocianidinas (Wannenmacher y col., 2018) (Tabla 3). Aunque estos antioxidantes propios de la cerveza pueden evitar reacciones de oxidación y *off-flavors* durante el almacenamiento (Aron y Shellhammer, 2010), es muy común el empleo de sulfitos en

la formulación de las cervezas de venta masiva para incrementar su estabilidad (Carneiro y col., 2006). La incorporación de ingredientes poco convencionales en la elaboración de cerveza ha sido, y es, una práctica habitual de los cerveceros que buscan elaborar nuevos estilos, con diferentes colores y sabores (Tonsmeire, 2014). Además, la adición de matrices ricas en antioxidantes puede otorgar un beneficio adicional otorgando a las cervezas cierta protección contra el deterioro de origen oxidativo (Martínez y col., 2017a). En la última década se ha incrementado el interés por la incorporación a los alimentos con sustancias con actividad biológica que puedan otorgar un beneficio para la salud (Ulloa y col., 2017; Horincar y col., 2020). En esta línea, Kawa-Rygielska y col. (2019) encontraron que la adición de cornejo (*Cornus mas*) luego de la fermentación alcohólica resultó en cervezas con mayor nivel de fenoles (70 %) y actividad antioxidante que las elaboradas con la adición de fruta antes de la fermentación. Aquí el calafate fue adicionado luego de la fermentación con el objetivo de obtener una cerveza con el mayor valor agregado posible. La cerveza con el menor nivel de calafate duplicó la capacidad antioxidante de la cerveza control, y mayores incrementos fueron encontrados con mayores cantidades de fruta (Figura 12B). El impacto relativo en la capacidad antioxidante fue menor cuando se adicionaron mayores niveles de fruta, lo que puede indicar algún tipo de interacción entre los antioxidantes del fruto y algún/os componentes de la cerveza. Más allá de esto, la adición de 10 g L⁻¹ de calafate resultó en un producto varias veces superior que el control en capacidad antioxidante (Figura 12B). El incremento en la capacidad antioxidante se correlacionó con la cantidad de antocianinas de la cerveza ($R=0,951$; $p=0,000$) (Figuras 12A y 12B). El nivel de fenoles en cerveza depende de la materia prima, las prácticas de elaboración y del estilo de cerveza. Pero en general se considera que un 70-80 % de los fenoles provienen de la malta y el 20-30 % restante lo aporta el lúpulo (Wannenmacher y col., 2018). La incorporación de frutas en la elaboración también puede incrementar el nivel de fenoles (Kawa-Rygielska y col., 2019). En las cervezas comerciales de venta masiva el nivel de fenoles varía en un amplio rango de entre 22-300 mg L⁻¹. Este amplio

rango probablemente depende del tipo de cerveza (**Zhao y col., 2010; Patraşcu y col., 2018**). Igualmente, la presencia de antioxidantes de síntesis puede contribuir a esas diferencias (**Carneiro y col., 2006**). En este trabajo las cervezas terminadas tuvieron 152, 276, 300 y 360 mg L⁻¹ de fenoles totales para 0 (cerveza control), 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate, respectivamente (**Figura 12C**).

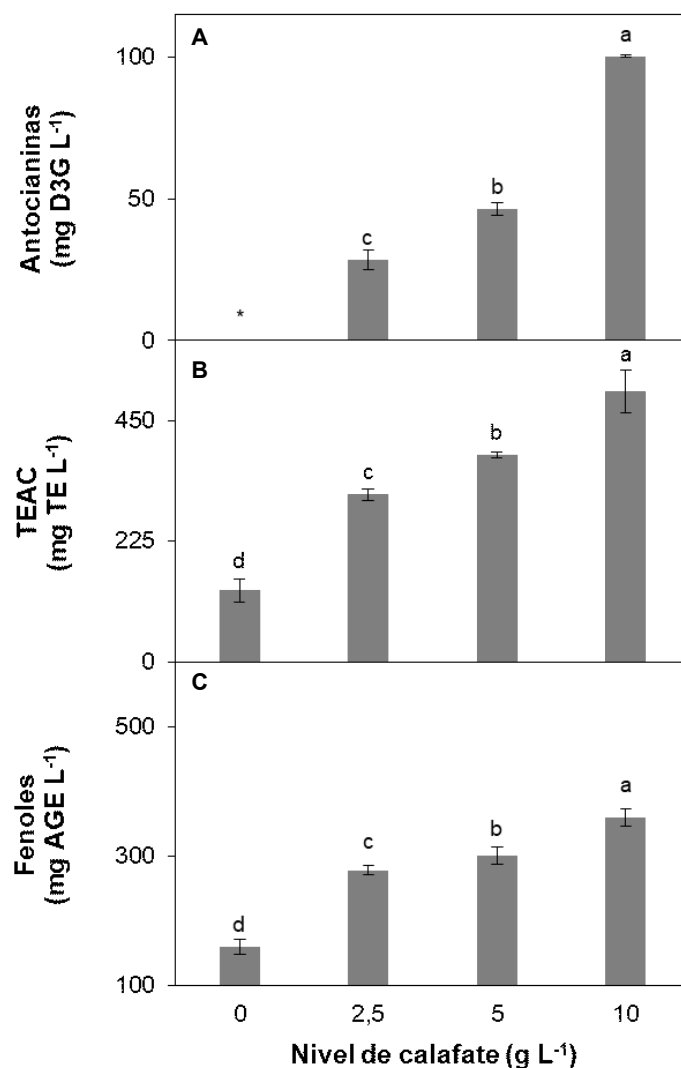


Figura 12: A. Antocianinas, B. TEAC (Trolox equivalents antioxidant capacity) y C. Fenoles de la cerveza sour enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado. Se muestra el promedio \pm error estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$.

4.1.2. Efecto de la adición de calafate en las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza

Como era de esperar la adición de un fruto con elevados niveles de pigmentos naturales en una cerveza base de color ámbar produjo un notable cambio de color hacia tonos

rojos en función de la cantidad de fruto adicionada (**Figura 13A**). El elevado nivel de antocianinas del calafate logró un marcado cambio de color en las cervezas aún con 2,5 g L⁻¹ de fruta. En la cerveza control el color EBC fue de 6 mientras que la componente roja fue prácticamente nula. Las cervezas con calafate tuvieron un color EBC de 10,3; 13,5 y 23,5 para 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate, respectivamente (**Figuras 13B y 13C**). El incremento en el color EBC de las cervezas con calafate puede deberse a que las antocianinas absorben en un amplio rango de longitudes de onda más allá de los 430 nm (**Ahliha y col., 2018**). En otro trabajo la adición de membrillo (*Cydonia oblonga*) a cerveza *American amber Ale* prácticamente no incrementó el color EBC (**Zapata y col., 2019**). La adición de calafate causó un significativo incremento en el componente rojo del color ($R=0,998$; $p=0,000$) y en la densidad de color ($R=0,997$; $p=0,000$) en asociación con la cantidad de fruta adicionada (**Figuras 13C y 13D**). Con 10 g L⁻¹ de calafate se observó un marcado descenso en el L^* , desde 19 hacia 11 (**Figura 13E**). El calafate produjo un efecto opuesto en los parámetros de color a^* y b^* , efecto que puede relacionarse a los componentes rojo y azul del color, respectivamente, aportados por las antocianinas (**Figuras 13F y 13G**). El mayor Δa^* se observó con el menor nivel de fruta, sin variaciones relevantes con mayores niveles de calafate. Contrariamente, el componente b^* del color se redujo en proporción al nivel de fruta utilizada en la elaboración ($R=0,913$; $p=0,001$). **Horincar y col. (2020)** también observaron una caída en el L^* junto con un incremento en el a^* en cerveza *Lager* enriquecida con cáscara de berenjena. Aunque en ese estudio se reportó un incremento en el b^* . El comportamiento observado por Horincar y col. pudo estar relacionado a la presencia de antocianinas en su forma chalcona amarilla, forma que se vuelve relevante en el equilibrio a pHs próximos a 4,5. La adición de calafate produjo cervezas *sour* con nuevas tonalidades rojas que pueden seleccionarse en función de la cantidad de fruto utilizado en la elaboración. Esto no significa que la cerveza sea atractiva para los consumidores, pero al menos ofrece nuevas opciones de productos para el creciente mercado de la cerveza.

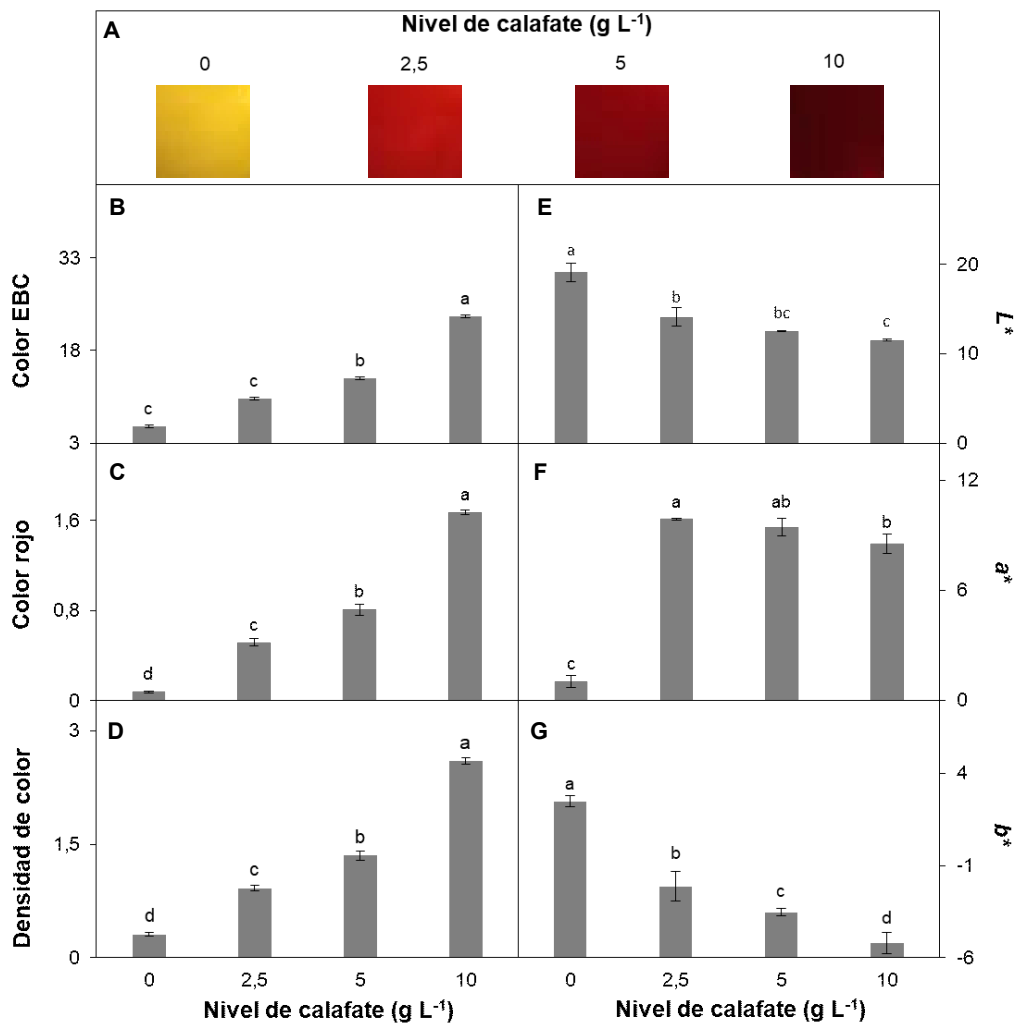


Figura 13: A. Fotos de las cervezas, B. Color EBC (European Brewing Color), C. Color rojo, D. Densidad de color, E. Luminosidad (L^*), y parámetros de color F. a^* y G. b^* de la cerveza sour enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 $g L^{-1}$ de calafate liofilizado. Se muestra el promedio \pm error estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$.

Las cervezas tuvieron un pH en torno a 3,4. La adición de calafate no afectó el pH de la cerveza (Tabla 5). Esto pudo deberse a que los pHs del fruto de calafate ($\sim 3,5$) y de las cervezas sour son muy cercanos. Contrariamente el aporte de ácidos orgánicos de flores de *Hibiscus sabdariffa* (Martínez y col., 2017b) o frutos de cornejo (Kawarygielska y col., 2019) redujeron el pH de la cerveza. El mayor nivel de calafate produjo un incremento en la acidez y densidad de la cerveza (Tabla 5). Una tendencia similar fue reportada en otros trabajos (Ulloa y col., 2017; Horincar y col., 2020).

En conjunto los resultados muestran que pequeñas cantidades de calafate pueden ser utilizadas para incrementar la capacidad antioxidante y elaborar cervezas *sour* de tonalidades rojas sin afectar la densidad ni el pH. Los niveles de antocianinas totales incorporados a la cerveza son dignos de destacar, ya que son valores comparables a los encontrados en jugos de uva (**Muche y col., 2018**).

TABLA 5: pH, acidez titulable y densidad de la cerveza *sour* enriquecida con 0 (control), 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado.

Parámetro	Fruto adicionado (g L ⁻¹)			
	0	2.5	5	10
<i>pH</i>	3,44 ±0,03a	3,44 ±0,02a	3,45 ±0,01a	3,41 ±0,01a
Acidez (mEq H ⁺ L ⁻¹)	63 ±6b	67 ±1b	68 ±6b	79 ±1a
Densidad (mg L ⁻¹)	1.010 ±0,7b	1.011 ±0,3ab	1.011 ±0,0ab	1.012 ±0,0a

Promedios ± error estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas en base al test de Tukey con un nivel de significancia de p <0,05.

Es muy importante para los cerveceros poder recibir una evaluación de las cervezas que elaboran. Entre los centenares de cervezas diferentes que se elaboran actualmente hay una tendencia a evaluarlas dentro de ciertos criterios o estilos (**Fitzpatrick y col., 2017**). La BJCP (“Beer Judge Certification Program”) apadrina competencias en las cuales está incluido el estilo “cerveza con fruta” (**Tonsmeire, 2014; Strong y England, 2015**). Cuando las cervezas con calafate fueron evaluadas dentro del estilo de cervezas con fruta por jueces entrenados, las cervezas con 5 y 10 g L⁻¹ de calafate obtuvieron los mayores puntajes (**Figura 14**). Debido a que la cerveza con 5 g L⁻¹ de calafate presentó un nivel elevado de antioxidantes conjuntamente con buenos atributos dentro del estilo de cervezas con fruta, este nivel de enriquecimiento fue elegido para los subsiguientes análisis. Se realizó un test de aceptabilidad de consumidores de la cerveza control (sin fruta) o con 5 g L⁻¹ de calafate (*n=64*). Los resultados de esta prueba indicaron que no hubo diferencias entre ambas cervezas en cuanto al aroma, mientras que la cerveza

con calafate obtuvo mayor puntaje en cuanto a impresión general, color y sabor (Tabla 6).

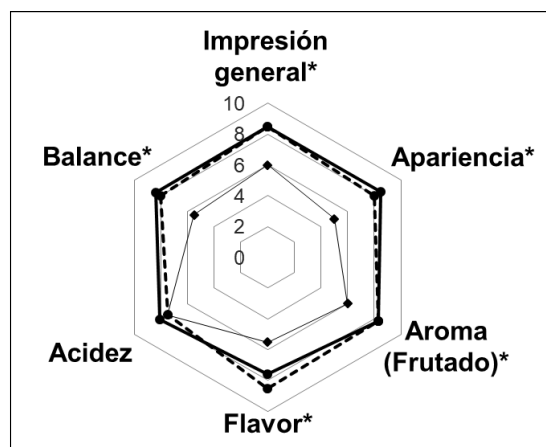


Figura 14: Promedio de las puntuaciones obtenidas del análisis sensorial con jueces entrenados, de la cerveza sour enriquecida con 2,5 (—◆—); 5 (—●—) y 10 g L⁻¹ (—◆—) de calafate liofilizado. Los asteriscos indican diferencias significativas en base al test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$; ($n=4$).

TABLA 6: Análisis sensorial con consumidores no entrenados, de las cervezas control o con 5 g L⁻¹ de calafate.

Atributo	Calafate agregado (g L ⁻¹)	
	0	5
Impresión general	7,3 ± 1,3b	7,8 ± 1,3a
Color	7,5 ± 1,4b	8,4 ± 1,3a
Aroma	7,6 ± 1,2a	7,7 ± 1,3a
Sabor	7,1 ± 1,5b	7,6 ± 1,2a

Promedios ± error estándar ($n=64$). Diferentes letras indican diferencias significativas en base al test de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.2. Calidad de la cerveza durante el almacenamiento

4.2.1. Análisis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la cerveza durante el almacenamiento

La creciente concientización por parte de los consumidores acerca del uso de aditivos de síntesis en los alimentos ha elevado el interés de la industria y el sistema científico

por evaluar pigmentos naturales capaces de colorear diferentes matrices alimenticias. Su elevada solubilidad en agua y capacidad colorante sumado a los efectos adicionales en cuanto a la actividad antioxidante y los efectos beneficiosos para la salud, convierten a las antocianinas en excelentes candidatos naturales para ser incorporados en matrices alimenticias (**Giusti y Wrolstad, 2003; Jin y col., 2014**). Sin embargo, esto no es sencillo debido a que, en muchos casos, en comparación a los aditivos de síntesis, las antocianinas poseen menor estabilidad (**Ertan y col., 2020**). Otros contrapuntos son que tanto la estabilidad como así también el color de las soluciones de antocianinas dependen del pH del medio en la que se encuentran (**West y Mauer y col., 2013**), y además existe riesgo de interacciones indeseables con otros componentes. En la elaboración de cerveza el colorante más utilizado es el colorante caramelo. Utilizado generalmente para realizar ajustes en el color. La utilización de otro pigmento en cerveza más allá del colorante caramelo está prácticamente supeditado a la incorporación de vegetales, principalmente frutas. Aunque se ha reportado una tendencia a la degradación del color en las cervezas con antocianinas durante el almacenamiento (**Martínez y col., 2017b**), son pocos los trabajos que han analizado este aspecto en las cervezas con fruta. Por otra parte, son muy pocos los trabajos que han evaluado la estabilidad de las cervezas tipo *sour* durante el almacenamiento. Para evaluar esto, se elaboraron una cerveza control y otra con 5 g L⁻¹ de calafate. Ambas cervezas fueron embotelladas en botellas de 350 mL color caramelo, almacenadas a 5 °C por 3 meses y muestreadas mensualmente. Se analizó la calidad durante el almacenamiento focalizando en la capacidad antioxidante y el nivel de antocianinas. La concentración de antocianinas en las cervezas con calafate se ubicó en torno a 45 mg D3G L⁻¹, sin cambios significativos durante el almacenamiento (**Figura 15A**). Estos resultados no concuerdan con otros trabajos en donde se reportó una elevada inestabilidad de las antocianinas (**Martínez y col., 2017a; Horincar y col., 2020**). La estructura química de las antocianinas tiene implicancia en la estabilidad de las mismas.

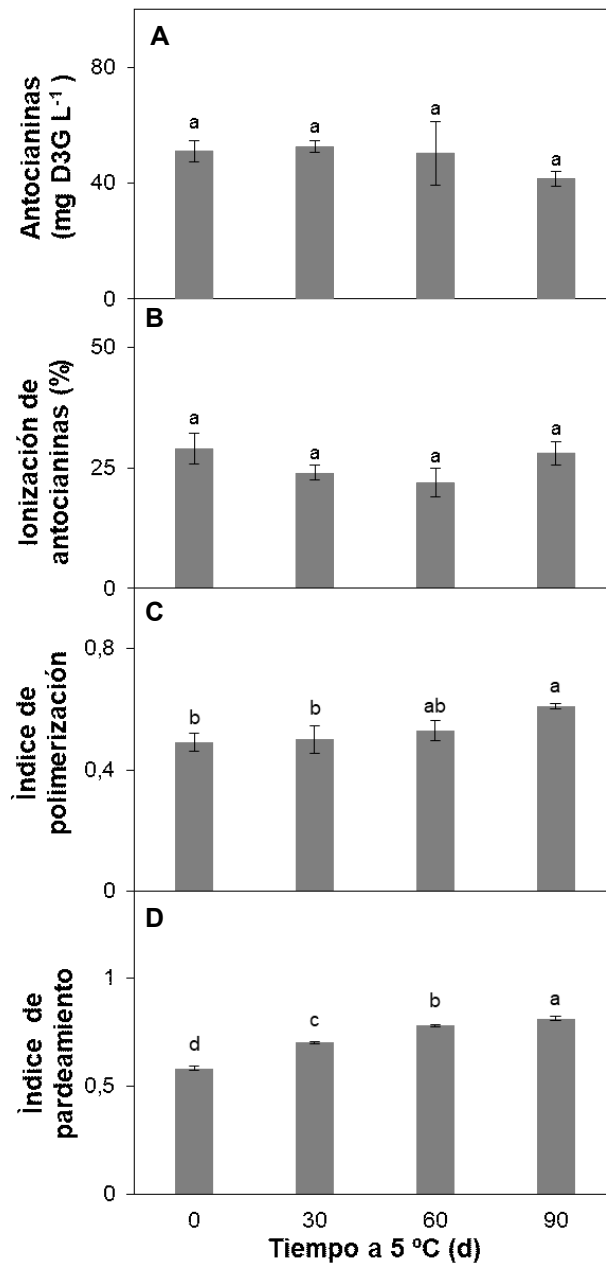


Figura 15: A. Antocianinas, B. Porcentaje de ionización de antocianinas, C. Índice de polimerización, y D. Índice de pardeamiento (L*) de la cerveza sour control o enriquecida con 5 g L⁻¹ calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio \pm error estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$.

Las antocianinas mono-glicosidadas son menos estables que las poli-glicosidadas o las acetiladas (Ertan y col., 2020). En los frutos de calafate predominan las formas monoglicosidadas, por lo cual las antocianinas de este fruto no serían las más estables en términos de su grado de glicosidación o acetilación (Ruiz y col., 2010). De todas

maneras, tanto el color como la estabilidad de las antocianinas dependen en gran medida de la matriz en la cual se encuentran, un factor que puede llegar a ser incluso más relevante que la estructura de estas moléculas (**West y Mauer, 2013**). Además, los compuestos fenólicos de bajo peso molecular pueden llegar a formar complejos de co-pigmentación a través de orbitales π - π incrementando notablemente la estabilidad de las antocianinas (**Ertan y col., 2020**). Algunos de estos fenoles son comúnmente encontrados en granos de cereales, como por ejemplo los ácidos p-cumárico, sináptico y ferúlico, pudiendo estabilizar las antocianinas en una matriz de cerveza (**Anexo**) (**Fan y col., 2019**). Es digno de destacar que el ácido ferúlico, que posee una elevada tendencia a formar este tipo de complejos, es en general el ácido fenólico mayoritario en cerveza (**Piazzon y col., 2010, Tabla 3**). Se ha reportado que la co-pigmentación genera un efecto *batocrómico*, es decir, un viraje hacia tonalidades más azuladas del color rojo del vino tinto (**Schwarz y col., 2005**). Esto podría relacionarse con el cambio de b^* observado (**Figura 13G**). Más allá de lo anterior, el pH es el factor que más influencia tiene en la estabilidad de las antocianinas en una matriz alimenticia (**West y Mauer, 2013**). El pH gobierna el equilibrio entre las diferentes especies moleculares de las antocianinas. En solución las antocianinas totales son la sumatoria de diferentes especies en equilibrio comprendidas por la forma quinona, carbinol/chalcona y ion flavilio (**West y Mauer, 2013**), siendo la última especie la más estable y la prevalente a pHs bajos (**Somers y Evans, 1974**). Es de destacar que entre el 20-30 % de las antocianinas de la cerveza con calafate se encontraron en su forma estable de ion flavilio (**Figura 15B**), un porcentaje superior al informado en algunos vinos (**Tavares y col., 2017**). Durante el almacenamiento el grado de ionización (GI) se redujo a los 30 y 60 días y luego se incrementó hacia los 90 d. El bajo pH de la cerveza *sour* probablemente favoreció los elevados valores de GI. También se analizó el índice de polimerización (IP), que es una estimación de la cantidad de polímeros pardos (provenientes de la degradación de las antocianinas) presentes luego del blanqueado con SO₂ (**Versari y col., 2008**). No se evidenciaron cambios en el IP luego de 60 días (**Figura 15C**). Luego

un incremento en el IP fue detectado. En tanto que el índice de pardeamiento se incrementó durante el almacenamiento, aunque dicho incremento fue limitado y difícilmente tenga alguna influencia en la calidad sensorial del producto (**Figura 15D**).

La capacidad antioxidante y los fenoles totales de las cervezas con o sin fruta adicionada durante el almacenamiento fueron determinados por medio del catión ABTS^{•+} y del reactivo de molibdeno-tungsteno de Folin-Ciocalteu, respectivamente. Ambos métodos mostraron la misma tendencia en ambas cervezas (**Figuras 16A y 16B**), confirmando que los antioxidantes fenólicos son los compuestos más relevantes en la capacidad antioxidante de esta matriz. Transcurridos 30 d, en la cerveza control la capacidad antioxidante se incrementó un 30 % y luego permaneció estable hasta 90 d. Este comportamiento contrasta con la reducción en fenoles generalmente observada en otros trabajos durante el almacenamiento de cerveza (**Wannenmacher y col., 2018**). El incremento observado pudo deberse a la formación de fenoles de alto peso molecular con mayor reactividad al ABTS^{•+} y Folin-Ciocalteu que sus homólogos de bajo peso molecular (**Callemien y Collin, 2009**). La capacidad antioxidante de la cerveza con calafate duplicó la de los controles y fue estable durante el almacenamiento (**Figura 16**). La adición de calafate permitió obtener una cerveza enriquecida en antocianinas y con elevada capacidad antioxidante que fue estable durante el almacenamiento a 5 °C por 90 d.

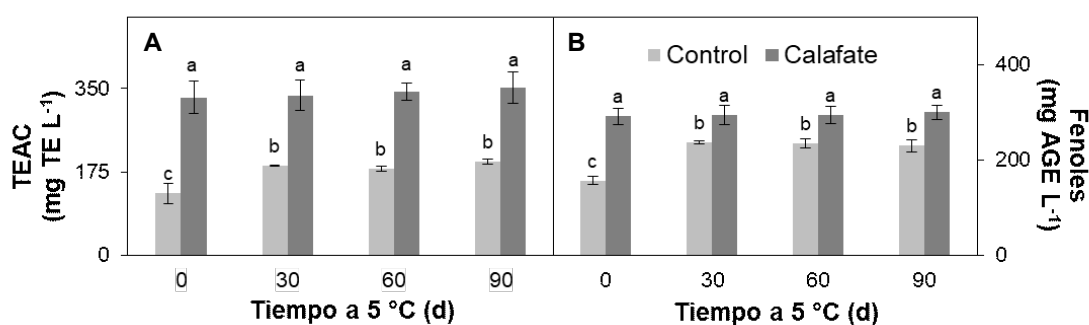


Figura 16: A. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) y B. Fenoles de la cerveza sour control o enriquecidas con 5 g L⁻¹ de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio ± error estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de p < 0,05.

4.2.2. Análisis de las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza durante el almacenamiento

La **Tabla 7** muestra el pH, acidez y la densidad de las cervezas control y con calafate durante el almacenamiento. El pH de ambas cervezas fue próximo a 3,4 sin variaciones durante el almacenamiento. El pH está relacionado con la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de las cervezas, por lo que se busca que permanezca sin variación. La acidez y la densidad se ubicaron en torno a 70-78 meq H⁺ L⁻¹ y 1.009-1.011 g L⁻¹ respectivamente.

TABLA 7: pH, acidez titulable y densidad de la cerveza *sour* control o enriquecida con 5 g L⁻¹ de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d.

	Tiempo a 5 °C (d)	Control	Calafate
<i>pH</i>	0	3,44 ±0,02a	3,45 ±0,03a
	30	3,32 ±0,07b	3,32 ±0,07a
	60	3,51 ±0,02a	3,43 ±0,15a
	90	3,42 ±0,04ab	3,45 ±0,05a
<i>Acidez</i> (mEq H ⁺ L ⁻¹)	0	70 ±1a	72 ±2a
	30	78 ±8a	78 ±4a
	60	73 ±11a	71 ±7a
	90	74 ±12a	70 ±4a
<i>Densidad</i> (mg L ⁻¹)	0	1.010 ±1,0a	1.011 ±0,2a
	30	1.009 ±2,3a	1.010 ±0,0a
	60	1.009 ±0,6a	1.010 ±1,0a
	90	1.011 ±0,6a	1.011 ±1,0a

Promedios ± error estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas en base al test de Tukey con un nivel de significancia de p <0,05.

El color EBC fue de 6 y 11 en las cervezas control y con calafate adicionado, respectivamente (**Figura 17A**). Durante el almacenamiento se detectó un leve incremento en el color EBC. En la cerveza control no se observaron cambios en el

componente de color rojo o la densidad de color durante el almacenamiento (**Figuras 17B y 17C**). Este comportamiento está en línea con **Vanderhaegen y col. (2007)**, quienes observaron mayor estabilidad del color en las cervezas de claras y de bajo contenido alcohólico en comparación a las más oscuras y de mayor graduación. A los 30 días se observó una reducción del 15 % en el color rojo de las cervezas con calafate (**Figura 17B**). Luego no se observaron cambios en este parámetro. La densidad de color tuvo un comportamiento similar (**Figura 17C**).

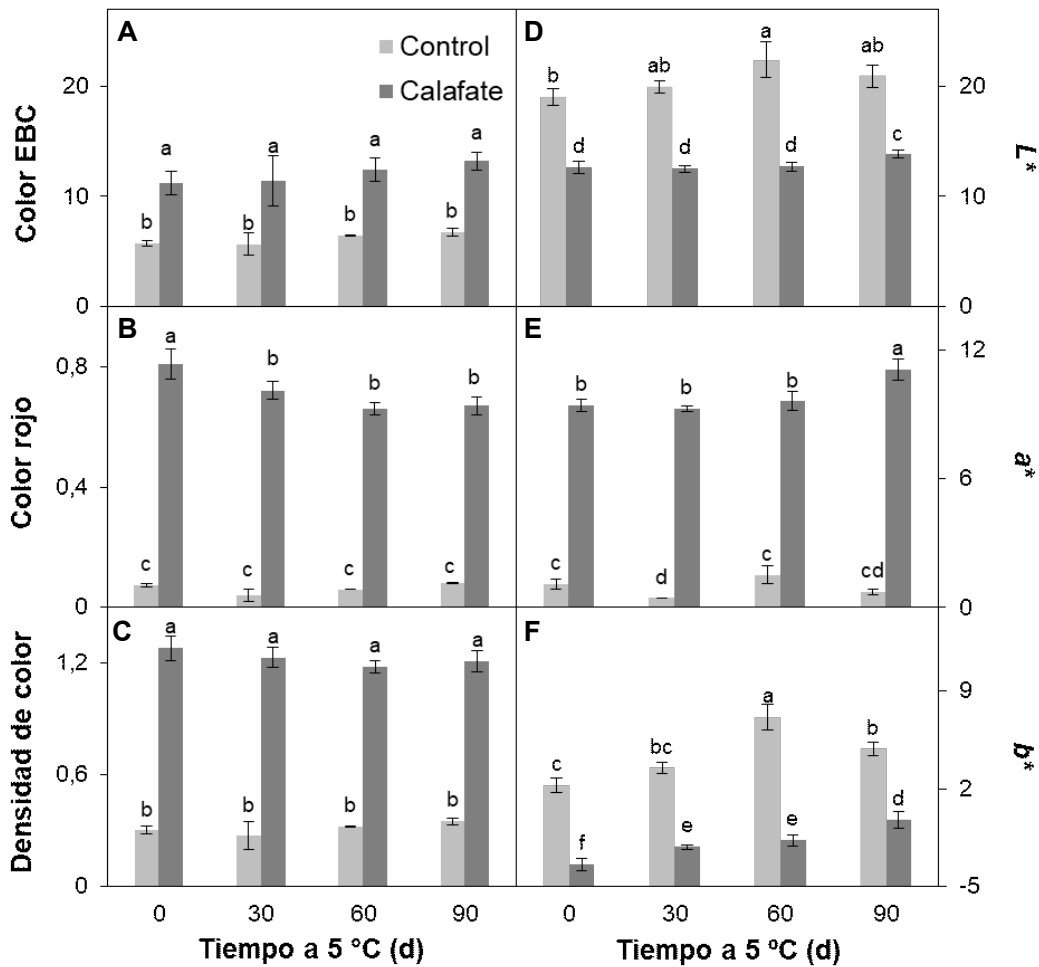


Figura 17: A. Color EBC (European Brewing Color), B. Color rojo, C. Densidad de color, D. Luminosidad (L^*), y parámetros de color E. a^* y F. b^* de la cerveza sour control o enriquecidas con 5 g L^{-1} de calafate liofilizado luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0, 30, 60 y 90 d. Se muestra el promedio \pm error estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en el test de Tukey con una significancia de $p < 0,05$.

Al inicio, la luminosidad (L^*) fue de 19 y 12,5 para las cervezas control y con calafate, respectivamente. El L^* de la cerveza se incrementó entre 1-2 unidades durante el almacenamiento, siendo el incremento más notorio en las cervezas control (**Figura 17D**). El componente amarillo (b^*) del color de las cervezas control se incrementó durante el almacenamiento hasta los 60 d, y luego se redujo a los 90 días (**Figura 17F**). En cerveza Pilsen enriquecida con cascara de berenjena, ambos parámetros de color a^* y b^* disminuyeron durante el almacenamiento. Este comportamiento fue adjudicado a la baja estabilidad de las antocianinas en dicha matriz (**Horincar y col., 2020**). Contrariamente, en la cerveza con calafate se observó un incremento en a^* y en b^* durante el almacenamiento (**Figuras 17E y 17F**). Observamos una alta correlación entre el pardeamiento y el parámetro de color b^* durante el almacenamiento ($R=0,910$; $p=0,000$).

Finalmente, el análisis sensorial por jurados entrenados de las cervezas control y adicionadas con calafate se muestra en las **Figuras 18A y 18B**, respectivamente. Los atributos de acidez y balance se redujeron luego de 90 días en la cerveza control, mientras que no se observaron cambios en los atributos de las cervezas enriquecidas con calafate.

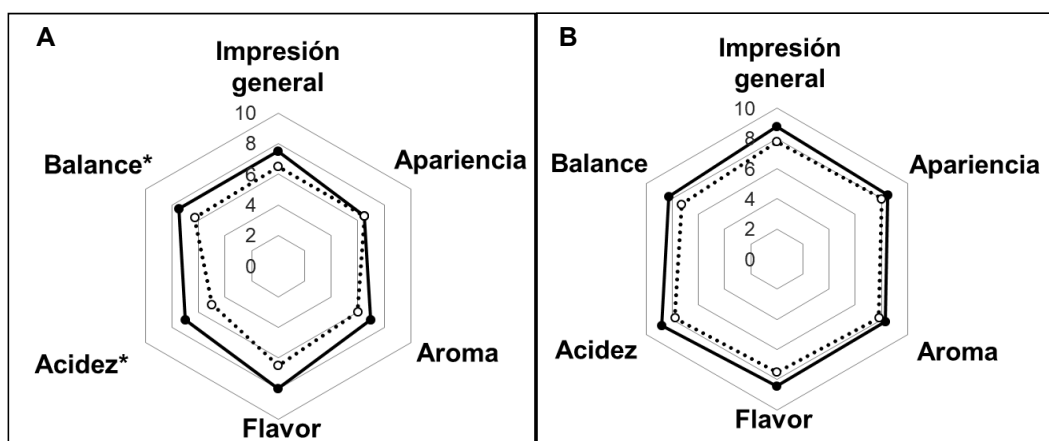
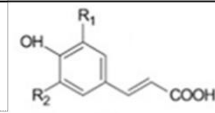
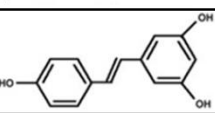
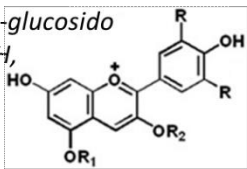
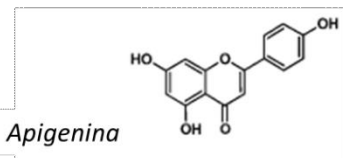
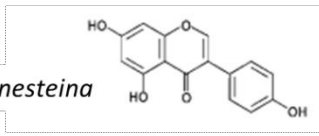
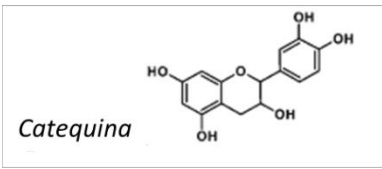
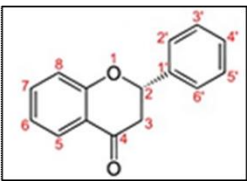
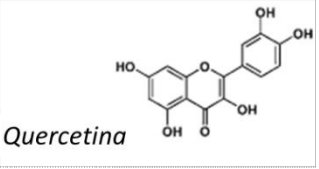
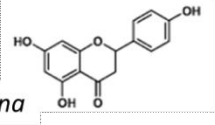
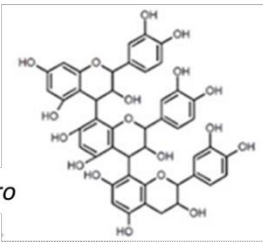


Figura 18: Promedios de los puntajes de la evaluación sensorial con jueces entrenados luego del almacenamiento en botella a 5 °C por 0 (—●—) y 90 (··○··) días de la cerveza sour control (A) y enriquecidas con 5 g L⁻¹ de calafate liofilizado (B). Los asteriscos indican diferencias significativas en base al test de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$; ($n=4$).

5. CONCLUSIONES

El calafate liofilizado en el rango de 2,5-10 g L⁻¹ causó un marcado incremento en el color rojo de la cerveza *sour*, así como también en su capacidad antioxidante. Luego la incorporación de 5 g L⁻¹ de calafate resultó en cervezas rojas color rubí con buenos atributos de una cerveza con fruta y con el doble de capacidad antioxidante que el control. En tanto que el pH, la acidez y la densidad no fueron afectados por la adición de fruta. La adición de fruta no causó cambios en el aroma, pero si incrementó el color, el *flavor* y la aceptabilidad general. Se demostró que la cerveza con calafate es estable luego de 90 días de almacenamiento a 5 °C, sin cambios relevantes en el color, el nivel de antocianinas, la capacidad antioxidante, pH, acidez o densidad. La estabilidad del color estuvo ligada al bajo pH de la cerveza *sour*, que mantuvo una elevada proporción de antocianinas en su forma ionizada flavilio más estable. La cerveza *sour* con calafate de color rojo rubí puede ser una nueva opción de cerveza enriquecida con antioxidantes naturales, estable y con buenas características sensoriales. Este trabajo muestra una nueva y factible opción de utilización de los frutos de calafate en la industria alimenticia.

6. ANEXO: Compuestos fenólicos encontrados en vegetales y sus fuentes más relevantes (Dimitrios, 2006; Egert y Rimbach, 2011; Wang y col., 2011)

<p>Ácidos fenólicos</p>		<p><i>R1 y R2=H p-cumárico</i> <i>R1 y R2=OCH₃ sináptico</i> <i>R1=OCH₃ y R2=H ferúlico</i></p>
<p>Estilbenoides</p>		<p><i>Resveratrol</i></p>
<p>Flavonoides</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><u>Antocianinas</u></p> <p><i>Delfinidina-3-glucosido</i> <i>R=OH, R1=OH, R2=glucosa</i></p>  <p><u>Flavonas</u></p>  <p><i>Apigenina</i></p> <p><u>Isoflavonas</u></p>  <p><i>Ginesteina</i></p> <p><u>Flavonoles (Flavan-3-oles)</u></p>  <p><i>Catequina</i></p> </div> <div style="width: 45%;">  <p><u>Flavonoles</u></p>  <p><i>Quercetina</i></p> <p><u>Flavanonas</u></p>  <p><i>Naringenina</i></p> <p><u>Pro-antocianidinas</u></p>  <p><i>Trimero</i></p> </div> </div>		

Algunas de las principales fuentes vegetales de compuestos fenólicos son:

Ácidos fenólicos: Berries, cítricos, ciruela, manzana, pera, kiwi.

Estilbenoides: Uvas.

Antocianinas: Berries, uva, berenjena.

Flavonas: Perejil, puerro, kale.

Isoflavonas: Poroto de soja, harina de soja.

Flavanoles: Berries, ciruela, manzana, pera, kiwi, arvejas, té.

Flavonoles: Uva, cítricos, cebolla, té.

Flavanonas: Cítricos

Pro-antocianidinas: Té, legumbres, vino.

7. REFERENCIAS

- Ablin, A. (2014). El mercado de la cerveza. *Informe sectorial*, (3).
- Ahliha, A. H., Nurosyid, F., Supriyanto, A., & Kusumaningsih, T. (2018). Optical properties of anthocyanin dyes on TiO₂ as photosensitizers for application of dye-sensitized solar cell (DSSC). In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 333, 012018. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/333/1/012018>
- AOAC. (2012). Association of Official Analytical Chemists, 19th edition. Washington, DC.
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food quality and preference*, 41, 214-224.
- Alonso, J., Desmarchelier, C. (2006). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Fitotecnia Ed. 680 p. Buenos Aires, Argentina.
- Aparicio R. (2010). Diacetilo: Su producción y reducción. *Revista Mash-Ciencia Cervecera*. Acceso 2020 en: <https://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=367>
- Arena, M. (2018). El rol de los factores epigenéticos en la calidad nutracéutica de los frutos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.) de la Patagonia. SeCyT UM. <https://repositorio.unimoron.edu.ar/handle/10.34073/42>
- Arena, M. E., Zuleta, A., Dyer, L., Constenla, D., Ceci, M., & Curvetto, N. R. (2013). *Berberis buxifolia* fruit growth and ripening: evolution in carbohydrate and organic acid contents. *Scientia Horticulturae*, 158, 52-58.
- Arena, M. E., Postemsky, P., & Curvetto, N. R. (2012). Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zealand Journal of Botany*, 50, 15-28.
- Arena, M. E., & Curvetto, N. (2008). *Berberis buxifolia* fruiting: Kinetic growth behavior and evolution of chemical properties during the fruiting period and different growing seasons. *Scientia Horticulturae*, 118, 120-127.
- Arias, G. (1991). Calidad Industrial de la Cebada Cervecera. St. N°18. Montevideo. Uruguay. Ed. Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry* 73, 239-244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Aron, P. M., & Shellhammer, T. H. (2010). A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing* 116, 369-380. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>
- Berlinger, A. (2019). Cerveza en Argentina: una industria con 200 años de historia. Nota diario *Ámbito Financiero*. Acceso 2020, en: <https://www.ambito.com/lifestyle/cerveza/argentina-una-industria-200-anos-historia-n5046102>
- Bottini, M.C.J., & Bustos, C., & Bran, D. (1993). Arbustos de la Patagonia, Calafates y Michay. *Presencia*, 8, 5-9.
- Brewers Association. Stats and data. Economic Impact. Acceso 2020, en: <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/economic-impact-data/>
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porrás, M. (2012). Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology* 26, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Caffaratti, S. (2020). Malteado y Tostado. En: *Somos Cerveceros*. Acceso 2020: <http://somoscerveceros.com/2011/03/01/malteado-y-tostado/>
- Callemien, D., & Collin, S. (2009). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer- A review. *Food Reviews International*, 26, 1-84. <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>

- Carneiro, J. R., Guido, L. F., Almeida, P. J., Rodrigues, J. A., & Barros, A. A. (2006). The impact of sulphur dioxide and oxygen on the behaviour of 2-furaldehyde in beer: an industrial approach. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 545-552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01104.x>
- Ceppi, E. L., & Brenna, O. V. (2010). Experimental studies to obtain rice malt. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 7701-7707.
- CAA. Código Alimentario Argentino, Capítulo XIII: Bebidas Fermentadas. Acceso 2020. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulospdf/Capitulo_XIII.pdf
- De Gaetano, G., Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A., Chiva-Blanch, G., Estruch, R., La Vecchia, C., Panico, S., Pounis, G., Sofi, F., Stranges, S., Trevisan, M., Ursini, F., Cerletti, C., Donati, M.B., & Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26, 443-467.
- De Michelis A., & Ohaco E. (2015). Deshidratación y desecado de frutas, hortalizas y hongos - Procedimientos hogareños y comerciales de pequeña escala. INTA Ediciones. Comunicación técnica nº 84 área desarrollo rural ISSN 1667-4014
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology*, 17, 505-512.
- Dysvik, A., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Westereng, B., Rukke, E. O., De Rouck, G., & Wicklund, T. (2019). Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. *Journal of the Institute of Brewing* 125, 342-356. <https://doi.org/10.1002/jib.569>
- Egert, S., & Rimbach, G. (2011). Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Advances in Nutrition*, 2, 8-14.
- Ertan, K., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chemistry* 310, 125856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125856>
- Factoría de cerveza. (2019). La producción de cerveza artesanal a nivel mundial superó los 74 millones de Hl. *Factoría de Cerveza*. Acceso 2020 en: <https://factoriadecerveza.com/la-produccion-de-cerveza-artesanal-a-nivel-mundial-supero-los-74-millones-de-hl/>
- Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food Chemistry* 275, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103>
- Fitzpatrick, L., Strong, G., Houseman, D., & Dixon, M. (2017). Competition Handbook. Beer Judge Certification Program, Inc. Downloaded from: www.bjcp.org
- Forde, G. (2017). Examining craft brewing as a social innovation process. Master's Thesis Aalto University School of Arts, Design and Architecture Department of Design. Helsinki, Finland. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:aalto-201707046140>
- Giacosa A., Barale R., Bavaresco L., Faliva M. A., Gerbi V., Vecchia C. L., Negri E., Opizzi A., Perna S., Pezzotti M. & Rondanelli M. (2014). Mediterranean way of drinking and longevity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56, 635-640. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.747484>.
- Gigliarelli P. (2018). Técnicas de lupulización. Revista Mash-Ciencia Cervecera. Disponible en: <https://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=442>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14, 217-225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Gonzalez Insfran, J. M. (2019). ¿Apocalipsis Cerveceros? Lupulados (Episodio 7). En Spotify: <https://open.spotify.com/episode/7gE3vUI0LuT8SSySSbQbZq?si=ROEOCjzKTDOTCEiWNQazyA>

- González, M. (2017). Principios de elaboración de las cervezas artesanales. Lulu Press. Inc. North Carolina USA.
- Granada-Díaz H. A., & Salamanca-Grosso G. (2020) Cinética del proceso de fermentación de mostos en la producción de cerveza. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 7, 9-21. <https://doi.org/10.23850/24220582.2889>.
- Hager, A. S., Taylor, J. P., Waters, D. M., & Arendt, E. K. (2014). Gluten free beer—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 44-54.
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanu, G., & Aprodu, I. (2020). Value-Added Lager Beer Enriched with Eggplant (*Solanum melongena* L.) Peel Extract. *Molecules*, 25, 731. <https://doi.org/10.3390/molecules25030731>
- Hough, J. S. (1990). Biotecnología de la cerveza y de la malta. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Ismail, A. F., & Matsuura, T. (2018). Progress in transport theory and characterization method of Reverse Osmosis (RO) membrane in past fifty years. *Desalination*, 434, 2-11.
- Jin, X., Chen, M., Yi, L., Chang, H., Zhang, T., Wang, L., Ma, W., Peng, X., Zhou, Y., & Mi, M. (2014). Delphinidin-3-glucoside protects human umbilical vein endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 1941-1951. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400161>
- Jurková, M., Horák, T., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., & Kellner, V. (2012). Control of antioxidant beer activity by the mashing process. *Journal of the Institute of Brewing*, 118, 230-235.
- Kaplan, N. M., Palmer, B. F., & Denke, M. A. (2000). Nutritional and Health Benefits of Beer. *The American Journal of the Medical Sciences*, 320, 320-326. <http://doi.org/10.1097/00000441-200011000-00004>.
- Kawa-Rygielska, J., Adamenko, K., Kucharska, A. Z., Prorok, P., & Piórecki, N. (2019). Physicochemical and antioxidative properties of cornelian cherry beer. *Food Chemistry*, 281, 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.093>
- Kirin, Holding Company. (2019). Global Beer Consumption by Country in 2018. Kirin Beer University Report. https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2019/1224_01.html#table3
- Krofta, K., Mikyška, A., & Hašková, D. (2008). Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. *J. of the Institute of Brewing*, 114, 160-166.
- Kunze, W. (2006). Tecnología para cerveceros y malteros. VLB Berlin. https://www.vlb-berlin.org/sites/default/files/2018-02/Kunze_espanol-content.pdf
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14539-14544.
- Libkind D., & Bruzone, M. C. (2018) La madre estaba en la Patagonia: levaduras cerveceras. *Ministerio de Agroindustria de la Nación, Alimentos Argentinos*, 73, 3, 4-9
- Martínez, A., Vegara, S., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2017a). Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base. *Journal of the Institute of Brewing*, 123, 319-327. <https://doi.org/10.1002/jib.434>
- Martínez, A., Vergara, S., Herranz-López, M., Martí, M., Valero, M., Micol, V., & Saura, D. (2017b). Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 123, 58-65. <https://doi.org/10.1002/jib.387>
- Moghaddam, P. R., Fallahi, J., Shajari, M. A., & Mahallati, M. N. (2013). Effects of harvest date, harvest time, and post-harvest management on quantitative and qualitative

- traits in seedless bar - berry (*Berberis vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products*, 42, 30-36.
- Muche, B. M., Speers, R. A., & Rupasinghe, H. P. (2018). Storage temperature impacts on anthocyanins degradation, color changes and haze development in juice of "Merlot" and "Ruby" grapes (*Vitis vinifera*). *Frontiers in nutrition*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00100>
- Mukamal K. J., Chiuve S. E., & Rimm E. B. (2006). Alcohol consumption and risk for coronary heart disease in men with healthy lifestyles. *Archives of International Medicine*, 166, 2145-2150. <http://doi.org/10.1001/archinte.166.19.2145>.
- Mundo Cerveza. Central de Noticias de la Industria Cervecera. Acceso 2020. <https://www.mundocerveza.com/historia-de-la-cerveza/>
- Muñoz Jáuregui A. M., Fernández Giusti A., Ramos Escudero F., & Alvarado-Ortiz Ureta, C. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73, 30-40. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2007000100004&lng=es&tlng=es
- Nelson, M. (2005). *The barbarian's beverage: a history of beer in ancient Europe*. Routledge, Taylor & Francis Group Publishing. London and New York.
- Nova E., San Mauro-Martín I., Díaz-Prieto L. E., & Marcos A., (2018). Wine and beer within a moderate alcohol intake is associated with higher levels of HDL-c and adiponectin. *Nutrition Research*, 63, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.12.007>
- Olugbenga, O. J., & Aberuagba, F. (2012). An evaluation of the brewing attributes of maize (*Zea mays*). *Nigerian Journal of Technological Research*, 7.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud, (2018). Informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud. Washington, D.C. (OPS/NMH/19-012)
- Parker, D. K. (2012). Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In *Alcoholic beverages*, 133-158. Woodhead Publishing.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias Acido Lacticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8, 93-105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169235612010000100012&lng=en&tlng=es
- Parzanese M. (2012). Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos. Alimentos Argentinos – MinAgri Ficha N° 3. 1-12. www.alimentosargentinos.gob.ar
- Patraşcu, L., Banu, I., Bejan, M., & Aprodu, I. (2018). Quality parameters of fruit beers available on romanian market. *Scientific study & research*, 19, 323-335. <http://pubs.ub.ro/dwnl.php?id=CSCC6201803V03S01A0008>
- Piazzon, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10677-10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>
- Priest, F. & Stewart, G. (2006). *Handbook of Brewing*, Second Edition. CRC. Taylor & Francis.
- Radonjić, S., Maraš, V., Raičević, J., & Košmerl, T. (2020). Wine or Beer? Comparison, Changes and Improvement of Polyphenolic Compounds during Technological Phases. *Molecules*, 25, 4960.
- Ribeiro–Tafulo, P. A., Barbosa–Queiros, R., Delerue–Matos, C. M., & Ferreira–Sales, M. G. (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*, 43, 1702–1709.
- Rivera, A. (2018) Para que el calafate sea una fuente de materia prima segura y de calidad se requiere de investigación, innovación y desarrollo. Acceso 2020 en: <https://web.inia.cl/blog/2018/03/26/para-que-el-calafate-sea-una-fuente-de-materia-prima-segura-y-de-calidad-se-requiere-de-investigacion-innovacion-y-desarrollo/>

- Rodoni, L. M., Feuring, V., Zaro, M. J., Sozzi, G. O., Vicente, A. R., & Arena, M. E. (2014). Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). *Scientia Horticulturae*, 179, 233-238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.023>
- Ros, J. L. (1980). Estabilidad coloidal de la cerveza. España. Pamplona. Laboratorio Industrial de Bioquímica, D.L. ISBN: 84-300-2015-2
- Ruiz, A., Hermosin-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 6081-6089. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
- Sadowska, K., Andrzejewska, J., & Klóska, Ł. (2017). Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 1246-1251. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13391>
- Schwarz, M., Picazo-Bacete, J. J., Winterhalter, P., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8372-8381.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65, 357-364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x>
- Sommantico, S. (2019). Radiografía de la cerveza en Argentina: una agroindustria federal y en constante innovación. Nota de infocampo. Acceso 2020 en: <https://www.infocampo.com.ar/radiografia-de-la-cerveza-en-argentina-una-agroindustria-federal-y-en-constante-innovacion/>
- Somers, T. C., & Evans, M. E. (1974). Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 25, 1369-1379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740251105>
- Steele, M. (2017). Ipas Modernas. *Somos cerveceros, La Revista*, 7, 10-14. Disponible en: <http://somoscerveceros.com/2021/01/17/revista-ano-6-nro-7-2/>
- Strong, G., & England, K. (eds). (2015). Beer Judge Certification Program: 2015 style guidelines. Access 2020 in: https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf
- Tavares, M., Jordão, A. M., & Ricardo-da-Silva, J. M. (2017). Impact of cherry, acacia and oak chips on red wine phenolic parameters and sensory profile. *OENO One*, 51, 329-342. <https://doi.org/10.20870/oenone.2017.51.4.1832>
- Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A. E., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114, 434-439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.102>
- Tonsmeire, M. (2014). American sour beer: Innovative techniques for mixed fermentations. *Brewers Publications*. PO Box 1679, Boulder, Colorado 80306-1679.
- Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the addition of propolis extract on bioactive compounds and antioxidant activity of craft beer. *Journal of Chemistry*, 6716053. <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>
- Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*, 103, 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.062>

- Versari, A., Boulton, R. B., & Parpinello, G. P. (2008). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chemistry*, 106, 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.073>
- Wang, Y., Chung, S. J., Song, W. O., & Chun, O. K. (2011). Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the US diet. *The Journal of Nutrition*, 141, 447-452.
- Wannenmacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 953-988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>
- West, M. E., & Mauer, L. J. (2013). Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4169-4179. <https://doi.org/10.1021/jf400608b>
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). Yeast: the practical guide to beer fermentation. *Brewers Publications*.
- Yeo, H. Q., & Liu, S. Q. (2014). An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 1607-1618.
- Zanatta K, & Ferreira A. (2012). Curso de sommelier en cervezas. Instituto de la cerveza, Brasil: Acceso 2020, en <https://www.institutodacerveja.com.br/turma/t168/sommelier-decervejas-intensivo-sp>.
- Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Gironés-Vilaplana, A., Santos-Laxa, D., Noguera-Artiagab, L., & Carbonell-Barrachina, A. A. (2019). Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 103, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.002>
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119, 1150-1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>