ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS PRESENTES EN LA CERVEZA. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2018/19

Alumno: Álvaro Martínez Gómez
Tutor: Carlos Blanco Fuentes
Cotutora: Isabel Caballero Caballero

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

Índice.

Resumen. 1

Abstract. 1

1. Introducción. 2

2. Cerveza y compuestos antioxidantes presentes. 5

2.1. Compuestos fenólicos. 6
2.2. Productos de la reacción de Maillard (Melanoidinas). 6
2.3. Sulfitos. 7

3. Cuantificación de antioxidantes en cerveza. 8

3.1. Cuantificación del contenido total de fenoles. 9
3.2. Cuantificación de fenoles. 11
3.3. Cuantificación de melanoidinas. 13
3.4. Cuantificación de sulfitos. 14

4. Medida de la actividad antioxidante. 15

4.1 Actividad antioxidante de la cerveza. 16

5. Nuevas alternativas para incrementar la actividad antioxidante. 18

6. Conclusiones. 21

7. Bibliografía. 22

Anexo I. Fenoles con actividad antioxidante presentes en la cerveza. 31

Anexo II. Ensayos para la medida de la actividad antioxidante en cerveza. 41

Resumen.

La cerveza contiene varios compuestos con actividad antioxidante, algunos de los cuales están presentes en las materias primas y otros se forman durante el procesado. Los compuestos fenólicos, las melanoidinas y los sulfitos son de particular interés para los cerveceros porque se describen como antioxidantes que poseen diversas propiedades biológicas y a su vez están involucrados en la mejora de varias enfermedades. Es por ello que se abordará el estudio actual de las técnicas que permiten detectarlos y cuantificarlos. Los diferentes estudios analizados muestran diferencias entre el tipo de cerveza tanto para el contenido total de fenoles (TPC), como para la actividad antioxidante. Los ácidos ferúlico y gálico son los fenoles mayoritarios en cervezas, pero su proporción va a depender de las materias primas, del origen geográfico, del tipo de cerveza y del proceso de elaboración. El empleo de nuevas alternativas en la elaboración de cerveza permite obtener cervezas con un mayor contenido en antioxidantes.

Abstract.

Beer contains several compounds with antioxidant activity, some of them come from raw materials and others are formed during.the brew process. Phenolic compounds, melanoidins and sulphites are of particular interest to brewers because they are described as antioxidants that have several biological properties and at the same time they are involved in the improvement of various diseases. That is why, the current study of the techniques that allow detecting and quantifying them will be studied. The different studies analyzed, show differences between the beer type for the total polyphenol content (TPC) and for the antioxidant activity. Ferulic and gallic acids are the majority phenols in beers, but their proportion will depend on the raw materials, the geographical origin, the type of beer and the production process. The use of new alternatives in brewing allows to obtain beers with a higher antioxidant content.

Palabras clave.

Actividad antioxidante, antioxidantes, cervecería, cerveza, fenoles, melanoidinas, sulfitos, polifenoles.

Keywords.

Antioxidant activity, antioxidants, brewery, beer, phenols, melanoidins, sulphites, polyphenols.

1. Introducción.

La cerveza, es una de las bebidas más antigua, más consumida y más popular del mundo. Es una bebida alcohólica hecha a base de cebada (malta), lúpulo, agua y levadura. Dentro de los componentes de la cerveza este trabajo va a estar centrado en los antioxidantes que tienen especial importancia en el control de los radicales libres.

Los radicales libres son especies químicas que cuentan con electrones desapareados. Los radicales libres más frecuentes son: el anión superóxido, el radical hidróxilo, el radical alquilo, el radical alcoxilo, el radical peroxilo y el radical óxido nítrico. Estos radicales pueden ser generados en distintas formas, mediante catálisis enzimática o por metales de transición en sistemas químicos o biológicos. Los radicales pueden reaccionar con diversos compuestos por transferencia de electrón, transferencia de protón, abstracción de hidrógeno o mediante reacciones de adición, por este motivo son considerados como responsables de una serie de procesos no deseados como el envejecimiento, la degradación de materiales, la descomposición de alimentos, o el origen de muchas enfermedades. El interés actual está en encontrar antioxidantes que eviten los deterioros inducidos por radicales libres en las industrias químicas, farmacéuticas y de alimentos.

Se considera que existen compuestos antioxidantes de tres tipos (Aron et al., 2011): inhibidores de enzimas, quelantes de metales y captadores de radicales libres. Los dos primeros impiden la formación de radicales libres indirectamente, mientras que los del tercer grupo atrapan radicales directamente y se conocen como antioxidantes inhibidores de la cadena de propagación radicalaria.

En los sistemas biológicos los radicales libres son responsables de iniciar reacciones que dan lugar a modificaciones en lípidos insaturados (especialmente los poliinsaturados), las proteínas y los ácidos nucleicos (Sohrabvandi et al., 2012).

Entre los muchos componentes que presenta la cerveza, se encuentran los antioxidantes, siendo los principales los compuestos fenólicos, los productos de la reacción de Maillard (melanoidinas) y los sulfitos, sin olvidar que también existen, aunque en niveles más bajos, azúcares reductores, vitaminas, carotenoides y agentes quelantes que pueden actuar como antioxidantes (Zhao, 2014). Se estima que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en la cerveza derivan de la malta (70-80%) (Elrod, 2018; Gerhäuser et al., 2008)

La configuración electrónica de los polifenoles facilita la captación de especies radicalarias. La liberación de un electrón transfiere el carácter radical al polifenol (Figura

1), que generalmente es más estable y menos dañino que las especies radicalarias iniciales (Aron et al., 2011).

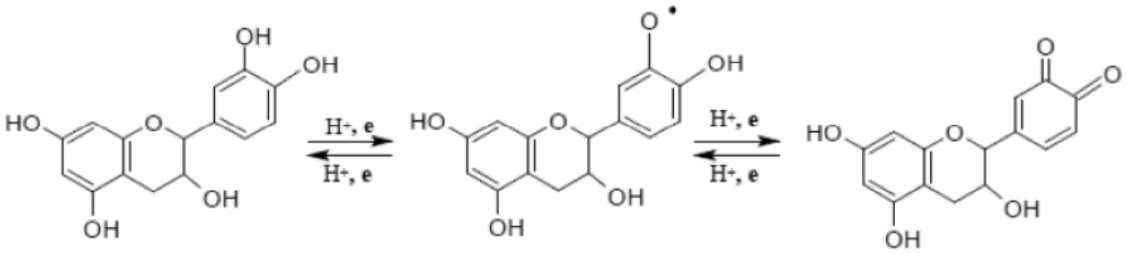


Figura 1. La oxidación de los flavan-3-oles produce, de manera mayoritaria, la especie radicalaria intermedia y posteriormente la especie estable final.

El contenido de antioxidantes en la cerveza es equivalente al de otras bebidas como el vino, la diferencia está en los productos de partida de cada bebida, en los vinos los antioxidantes provienen de las uvas mientras que en la cerveza provienen de la cebada y del lúpulo (Margo et al., 2000). Según un estudio publicado en 2010 (Pérez et al., 2010) la cerveza negra ocupa el puesto número 35 en el ranking de alimentos y/o bebidas con mayor cantidad de antioxidantes mientras que la cerveza rubia llega hasta el número 27.

Se ha comprobado que el consumo moderado de cerveza tiene efectos beneficiosos para la salud humana, muchos de los cuales se basan en las propiedades redox de los compuestos antioxidantes presentes en la cerveza (Arranz et al., 2012; Pérez et al., 2010).

Un consumo moderado de cerveza está asociado a un aumento de la densidad ósea, a beneficios cardiovasculares (de Gaetano et al., 2016) e inmunológicos y también se asocia a propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Redondo et al., 2018). Los fenoles presentes en la cerveza ayudan a disminuir la presión sanguínea e incrementan la concentración de óxido nítrico en el plasma reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (de Gaetano et al., 2016).

Se han llevado a cabo estudios donde se pone de manifiesto la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares cuando se consume cerveza de manera moderada y se ha visto que la reducción es mayor que cuando se consumen otros tipos de bebidas alcohólicas (Chiva et al., 2014). Esta disminución es, en parte, debida a la fracción alcohólica pero también por un tipo concreto de compuestos fenólicos presentes en la cerveza, los flavonoides. Estos compuestos, también poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e hipocolesterolémicas (Chen et al., 2010).

Además, los polifenoles evitan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Chen et al., 2010) ya que bloquean a los radicales libres que pueden oxidar grasas en el cuerpo (Sohrabvandi et al., 2012). También son capaces de provocar cambios en la microbiota del intestino (Cardona et al., 2013), cambios que se van a producir principalmente en el colon (Moreno, 2017).

Los polifenoles también se asocian a mejoras que experimentan las mujeres que se encuentran en la menopausia (Sandoval et al., 2017) y a mejoras observadas en personas que padecen artritis (Zamudio et al., 2017) pero la biodisponibilidad del polifenol asociado a este beneficio, el resveratrol, es baja (Navarro et al., 2018).

De manera más específica, se han estudiado algunos antioxidantes como el xanthohumol (flavonoide presente en la cerveza y encontrado únicamente en el lúpulo (Elrod, 2018)) y su producto de ciclación, el isoxanthohumol (Figura 2), y se ha comprobado que ambos tienen propiedades anticancerígenas.

El xanthohumol es beneficioso contra diferentes tipos de cáncer (Elrod, 2018) entre los que se encuentran: el cáncer de mama (Gerhäuser, 2005), de ovario (Gerhäuser, 2005), de próstata (Kłósek et al., 2016), de colon (Luescher et al., 2017) y de páncreas (Jiang et al., 2015) además de ser efectivo contra la leucemia (Monteghirfo et al., 2008), y proteger al ADN contra el daño oxidativo (Ferk et al., 2016). El xanthohumol también tiene efectos positivos contra la obesidad y la diabetes por la regulación del metabolismo de la glucosa y el colesterol (Miranda et al., 2016).

Aunque actúan de manera beneficiosa en el cuerpo humano existe cierta controversia en relación a sus propiedades debido a que la biodisponibilidad en la cerveza es baja (Arranz et al., 2012), por otra parte, está comprobado que el xanthohumol es más bioactivo que el isoxanthohumol (Faria et al.,2018). Otro compuesto, presente en la cerveza con capacidad anticancerígena y estructura similar es la 8-prenilnaringenina (Arranz et al., 2012) (Figura 2).

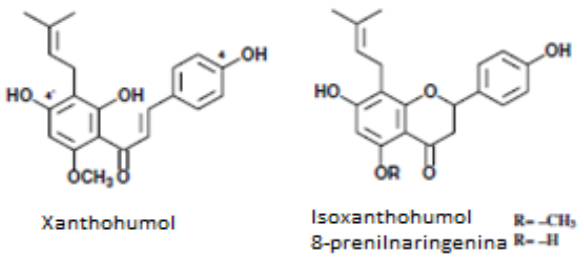


Figura 2. Estructura del xanthohumol, isoxanthohumol y 8-prenilnaringenina.

Debido a la elevada cantidad de antioxidantes presentes en la cerveza y sus importantes efectos sobre la salud humana, es necesario llevar a cabo una revisión de los antioxidantes que se encuentran en la cerveza y en qué proporción, así como los métodos más recientes para poder detectarlos y cuantificarlos. Dicha revisión se llevará a cabo en el presente trabajo, y, al final del mismo, también se expondrán las nuevas alternativas que se proponen para mejorar las propiedades antioxidantes de la cerveza.

2. Cerveza y compuestos antioxidantes presentes.

En función de la fermentación que se lleve a cabo para elaborar cerveza, ésta puede ser clasificada como de baja fermentación, alta fermentación o de fermentación espontánea.

- Cervezas de baja fermentación, dentro de esta categoría se incluyen las cervezas lager. El término lager proviene del alemán y significa almacenar, y es que este tipo de cervezas se almacenaban durante meses a temperaturas bajas. Utilizan levaduras que trabajan a baja temperatura (7 a 12ºC) denominadas *Saccharomyces ovarum*. En función de la zona de la que proceda se la denomina de una manera u otra, así tenemos pilsen (clara y ligera, es el tipo más extendido en España), munich (de color más oscuro y sabor a malta) o viena (más bien dulce y de color rojizo), entre otras. La mayoría son de color pálido, tienen una alta carbonatación y un sabor a lúpulo de medio a alto.
- Cervezas de fermentación alta, denominadas cervezas ale. Son cervezas cuya fermentación tiene lugar a una temperatura cercana a los 25°C y utilizan las levaduras denominadas *Saccharomyces cerevisiae*. Generalmente robustas y complejas, con una variedad de aromas a frutas y malta. Dentro de esta categoría se incluyen cervezas como abadía, stout o porter.
- Cervezas de fermentación espontánea o lambic. Esta última categoría hace referencia a cervezas cuya fermentación es espontánea gracias a cepas salvajes de levadura.

En función del tipo de cerveza que se analice se va a encontrar una diferente composición de antioxidantes.

Las cervezas presentan antioxidantes endógenos, de los cuales los más importantes son: los compuestos fenólicos, los productos de reacción de Maillard (melanoidinas) y los sulfitos.

2.1. Compuestos fenólicos.

Se han encontrado varias clases de compuestos fenólicos en la cerveza entre ellos fenoles simples, derivados del ácido benzoico, del ácido fenil acético, y del ácido cinámico, cumarinas, chalconas, proantocianinas, flavan-3-oles (catequinas), flavanonas, flavonas, flavonoles, α-ácidos e iso-α-ácidos (Aron et al., 2011). Los compuestos fenólicos aportan entre el 50% y 80% de la actividad antioxidante de la cerveza (Ceccaroni et al., 2019).

Los fenoles simples son moléculas como el 4-vinil fenol, 4-etil fenol o tirosol que son sustancias volátiles que van a conferir aromas a la cerveza pero que no destacan por su actividad antioxidante (Gerhäuser et al., 2008). En el Anexo I se muestran las moléculas fenólicas con actividad antioxidante que han sido detectadas en la cerveza (Gerhäuser et al.,2008; Wannenmacher et al., 2018).

2.2. Productos de la reacción de Maillard (melanoidinas).

Las melanoidinas son macromoléculas que se forman durante las últimas etapas de la reacción de Maillard (Pastoriza et al., 2014) producidas entre azúcares reductores y proteínas o aminoácidos. Concretamente en la cerveza estas melanoidinas se forman durante la maceración y la ebullición del mosto, y se conservan, al menos parcialmente, en la cerveza obtenida. Las melanoidinas generalmente están formadas por ciclaciones, deshidrataciones, retroaldolizaciones, reordenamientos, isomerizaciones y condensaciones de los productos iniciales de la reacción de Maillard (Figura 3), (Martins et al., 2012) pero muy pocas estructuras se han identificado completamente.

Las melanoidinas contribuyen a la formación del color, aroma y sabor de la cerveza, desempeñando también un papel importante en la estabilización de la espuma. Influyen en los procesos de oxidación-reducción de la cerveza junto con los fenoles debido a sus fuertes propiedades antioxidantes y otros efectos biológicos (Zhao, 2014).

Las melanoidinas presentes en las cervezas protegen al ADN del daño causado por especies reactivas de oxígeno (Langner et al., 2014). Son beneficiosas por sus propiedades antirradicalarias, antimutagénicas, antimicrobianas, antihipertensivas, antialérgicas, (Carvalho et al.,2014), antiinflamatorias, antitumorales y metabólicas (Garcia et al., 2013).

Las melanoidinas son las principales responsables de la actividad antioxidante de ciertos alimentos como la miel, el café o la malta, necesaria para elaborar cerveza (Carvalho et al., 2014). Esta actividad se suele atribuir a las propiedades quelantes de

metales, el poder reductor y la capacidad de captación de radicales libres que poseen las melanoidinas (Echavarría et al., 2012; Wang et al.,2011).

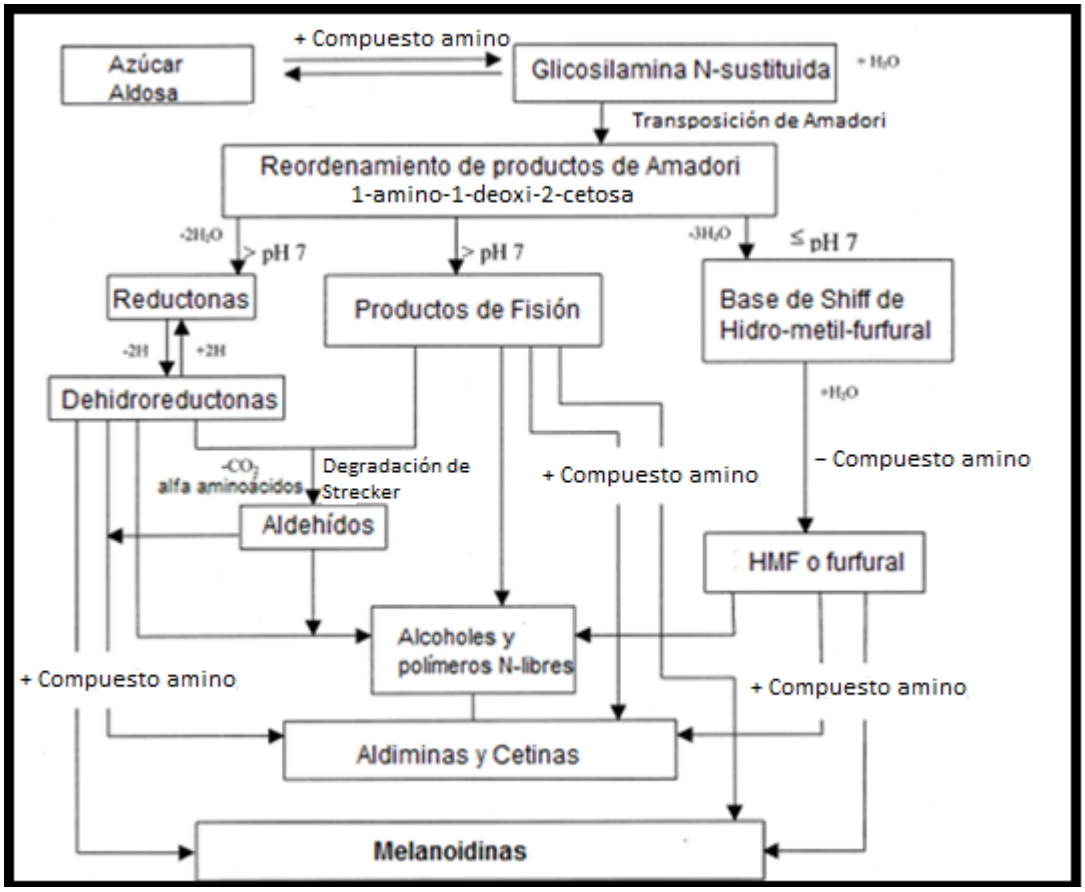


Figura 3. Esquema de reacciones de Maillard que tienen lugar en el proceso de elaboración de cerveza.

2.3 Sulfitos.

Los sulfitos se producen de forma natural en una serie de alimentos y bebidas como resultado de la fermentación, es el caso de la cerveza y del vino (Guido, 2016).

El sulfito únicamente se forma durante la fermentación (Kunz, et al., 2014) como subproducto en la síntesis de aminoácidos que contienen azufre durante la fermentación y persiste en la cerveza terminada. Las diferencias en la cepa de levadura y el proceso de elaboración de la cerveza llevan a variaciones significativas en el contenido de sulfito tras la maduración de la cerveza (Zhao, 2014).

El sulfito en la cerveza no solo actúa como antioxidante, sino que también actúa como estabilizante de su sabor. Se han propuesto dos mecanismos principales (Figura 4) para la estabilización de la cerveza mediante SO_2: uno es inhibir la oxidación de la

cerveza durante el almacenamiento actuando como antioxidante, el otro es la combinación con varios carbonilos para producir aductos de sulfito en la cerveza y así enmascarar el sabor persistente, ya que los aductos no son volátiles (Abrahamsson et al., 2013; Zhao, 2014).

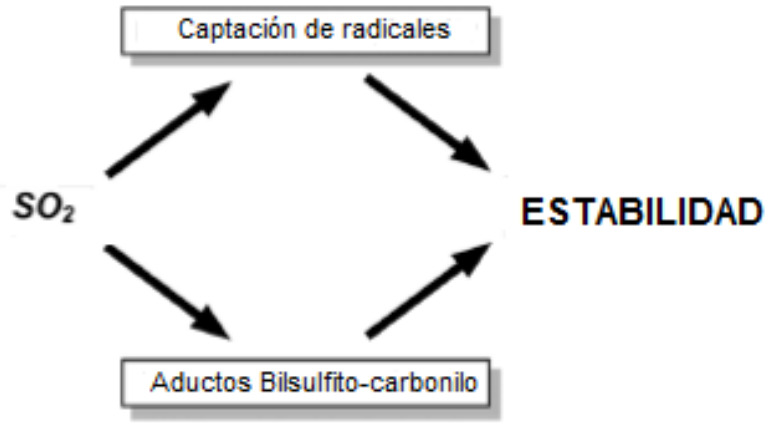


Figura 4. Mecanismos de actuación del dióxido de azufre en la estabilización de la cerveza.

Aparte del sulfito producido durante la fermentación, la industria cervecera utiliza dióxido de azufre durante el proceso de elaboración con diversas finalidades como, aumentar los rendimientos de las extracciones, controlar la formación de nitrosaminas, incrementar el nitrógeno soluble, actuar como conservante y obviamente como antioxidante (Guido, 2016).

3. Métodos analíticos empleados para la cuantificación de antioxidantes en cerveza.

La determinación de cada uno de los grupos de antioxidantes endógenos de la cerveza se lleva a cabo de distinta manera.

3.1. Cuantificación del contenido total de fenoles.

Actualmente existen diversos métodos analíticos para la cuantificación del contenido total de fenoles en cerveza, la mayoría de ellos basados en la reacción de los compuestos fenólicos con un reactivo colorimétrico y posterior medida de la absorción del producto coloreado obtenido en la región visible del espectro.

Los métodos clásicos más reconocidos para la determinación del contenido total de fenoles son: el ensayo Folin-Ciocalteu (FC), el ensayo del azul de Prusia y el ensayo

de Bishop (Fernández et al., 2014; Ulloa et al., 2017). Pese a ser tres métodos clásicos son los que se usan en la actualidad (Moura et al., 2016; Pai et al., 2013; Piazzon et al., 2010). De esos tres métodos, el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) es el que se utiliza de manera más habitual, y aunque existen variaciones, (Agbor et al., 2014; Sánchez et al., 2013) estas se fundamentan en una reacción REDOX entre el reactivo FC (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) y los fenoles, y la medición de la absorbancia a 725-760 nm del producto final azulado (Callemien et al., 2010) (Figura 5).

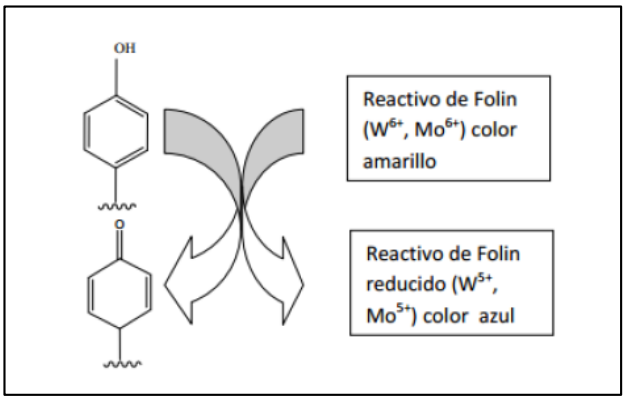


Figura 5. Esquema del ensayo de Folin-Ciocalteu.

El contenido total de fenoles se expresa generalmente como equivalentes de ácido gálico (GAE), y es necesario tener en cuenta que el reactivo FC no solo reacciona con sustancias fenólicas sino que también lo hace con otras sustancias reductoras, es por tanto un método poco selectivo.

El método de Bishop esta adoptado por la EBC (European Brewery Convention) como el método oficial y se basa en la quelación de polifenoles con Fe(III), en solución alcalina (pH 10 con amoníaco), para formar complejos rojos. La muestra se mezcla con carboximetilcelulosa/ácido etilendiametetraacético (CMC/EDTA) y reactivo férrico y se mide la absorbancia a 600 nm (Fernández et al., 2014).

Los métodos más modernos para determinar el contenido total de fenoles están basados en la utilización de microbiosensores, con los que se consigue una medida precisa, rápida y en tiempo real. Además se ha visto que no hay diferencias significativas entre estos métodos y el método de Folin-Ciocalteau (Cerrato et al., 2019). Se ha demostrado la capacidad de los biosensores para discriminar el contenido total de fenoles entre cervezas tipo lager y stout (García et al., 2018). Con sensores amperométricos también se ha podido determinar el contenido total de fenoles (ElKaoutit

et al., 2008) y además, se ha constatado que las medidas no se ven afectadas por la presencia de SO_2 (Martínez et al., 2010).

Las cervezas ricas en antioxidantes fenólicos muestran mayor calidad en ciertas propiedades sensoriales como son el sabor y el aroma además de ser más estables y tener una vida útil más larga que las cervezas cuyo contenido total de fenoles es bajo (Piazzon et al, 2010).

La clasificación de mayor a menor contenido fenólico sería:

cervezas frutales>cervezas oscuras>ale>lager>sin alcohol

De forma general las cervezas con mayor contenido fenólico son las cervezas frutales, ya que las frutas son una fuente importante de fenoles (Pérez et al., 2010). Se alcanzan valores de 1033 mg GAE/L para una cerveza belga con bayas de saúco (Koren et al., 2017) o 623 mg GAE/L para una cerveza con bayas de Goji (Ducruet et al., 2017).

Sin contar las cervezas frutales, son las cervezas oscuras (tostadas, negras) las que presentan mayor contenido de fenoles, obteniéndose valores de 300 mg GAE/L para cerveza negra tipo lager (Jurić et al,. 2015; Mitić et al., 2014), 362 mg GAE/L en cervezas brown ale (Granato et al., 2011) y 943 mg GAE/L o 875 mg GAE/L en cervezas bock (Koren et al., 2017; Piazzon et al., 2010). Todos estos estudios fueron realizados con el método FC excepto el de Juric et al., 2015 que fue realizado con el método Bishop.

Las cervezas ale tienen un contenido total de fenoles en torno a los 500 mg GAE/L (Marques et al., 2017) aunque también se encuentran valores inferiores, de 322 mg GAE/L para cerveza ale irlandesa (Koren et al., 2017). Dentro de las cervezas ale, las de tipo abadía, tienen una mayor cantidad de fenoles, 622 mg GAE/L medida por el método de FC (Piazzon et al., 2010).

La mayoría de los estudios están enfocados a la determinación del contenido en fenoles de cervezas lager. El estudio más amplio fue el llevado a cabo por Zhao et al. en 2010, en él se analizaban 34 cervezas comerciales tipo lager, resultando el contenido de fenoles entre 152 mg GAE/L en la cerveza Reeb y 339 mg GAE/L en la cerveza Carlsberg. El resto de estudios posteriores van en la línea del publicado por Zhao et al. en 2010 y los valores para el contenido total de fenoles para este tipo de cerveza se encuentran en un intervalo entre los 150 mg GAE/L de cervezas pale lager (Jurić et al., 2015) y cervezas lager polacas (Ditrych et., 2015) hasta los 621 mg GAE/L encontrados en una cerveza belga de tipo strong pale lager (Koren et al., 2017), valores intermedios se encuentran para cervezas tipo lager de Serbia con 419 mg GAE/L (Mitić et al., 2014),

301 mg GAE/L en cervezas indias (Pai et al., 2013), y 375 mg GAE/L en cervezas de Hungría (Koren et al., 2017).

Se han realizado estudios comparativos analizando cervezas sin alcohol y con alcohol encontrando que las primeras presentan un menor contenido en fenoles. Las cantidades encontradas para este tipo de cerveza han sido de 75 mg GAE/L (Ditrych et al., 2015), 80 mg GAE/L (Dvořáková et al., 2007), 200 mg GAE/L (Gorjanović et al., 2010), 232 mg GAE/L (Koren et al., 2017), 340 mg GAE/L (Mitić et al., 2014) y 366 mg GAE/L (Piazzon et al., 2010). El hecho de que la cerveza sin alcohol presente un contenido en fenoles más bajo es importante, ya que indica que la cerveza no ha sido elaborada con técnicas que permiten eliminar el alcohol sin alterar el resto de compuestos como puede ser la desalcoholización de cerveza mediante ósmosis inversa (Russo et al., 2013) o la utilización de membranas (Perretti et al., 2015), métodos que permiten desalcoholizar la cerveza sin alterar el contenido en fenoles.

Las cervezas elaboradas con trigo tienen un contenido total en fenoles similar a las elaboradas exclusivamente con malta, (Albanese et al., 2018; Fogarasi et al., 2015; Piazzon et al., 2010).

Comparando la cerveza con otras bebidas como el vino, la concentración de polifenoles tanto en las cervezas lager como ale es superior a la concentración encontrada en el vino blanco, si bien en el vino tinto la concentración es unas 25 veces superior a la de la cerveza (Pietro et al., 2012).

3.2. Cuantificación de fenoles.

Como se ha visto en el apartado anterior los métodos descritos para el análisis de fenoles totales no son específicos para los compuestos fenólicos ya que pueden presentar interferencias con otras sustancias reductoras, por ello la tendencia actual es analizar cada compuesto de manera individual tanto para la detección como la cuantificación.

La determinación individual de los fenoles presentes en cerveza suele ser compleja debido a que estos compuestos se suelen encontrar en baja concentración, por lo tanto la concentración previa de las muestras es una etapa necesaria y clave. Una posibilidad es la utilización de una etapa previa de separación utilizando cartuchos, seguido de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Con esta metodología pueden cuantificarse los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, así como los flavonoles (Dvořáková et al., 2007).

En un estudio publicado en 2007 por Dvořáková et al., simplemente se probaba la posibilidad de utilizar cartuchos como fase previa de preparación de la muestra. En estudios realizados posteriormente, ya se aplica esa metodología a muestras de cerveza comerciales (Chiva et al., 2011; Manfroi et al., 2019; Mitić et al., 2014; Piazzon et al., 2010; Zhao et al., 2010). Es importante destacar el estudio de Manfroi et al., puesto que en él se llevó a cabo la determinación simultánea de compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos en cervezas artesanas utilizando una única etapa de preparación de la muestra. Una alternativa a la utilización de cartuchos consiste en acidificar las muestras para posteriormente hacer una extracción líquido-líquido seguida de HPLC (Marova et al., 2011; Socha et al., 2017). La técnica de HPLC, con diferentes sistemas de detección, (Wannenmacher et al., 2018) es la más usada. Técnicas más avanzadas y complejas como es la cromatografía líquida acoplada a un sistema de espectroscopia de masas con ionización por electrospray y con trampa de iones cuadrupolar (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS) han permitido cuantificar hasta 47 compuestos fenólicos (Quifer et al., 2014).

Las materias primas utilizadas para la fabricación de cerveza influyen en el producto final, así como en el perfil de ácidos fenólicos. En la malta y el lúpulo varía su contenido en fenoles en función de la variedad utilizada, y también, el contenido varía en función de la región, el manejo y el procesamiento de los cultivos (Piazzon et al., 2010). A parte de las materias primas las técnicas de elaboración y el malteado afectan a la composición química del producto final, lo que podría explicar las diferencias en el perfil de los compuestos fenólicos entre las cervezas de diferentes países (Humia et al., 2019). Sin embargo, independientemente de su perfil, se ha comprobado que altos contenidos de compuestos fenólicos se encuentran asociados con un mejor sabor y una mayor estabilidad de la cerveza (Moura et al., 2016; Zhao, et al., 2013).

Se han identificado más de 50 compuestos fenólicos en cerveza (Pai et al., 2013). La recopilación más actual sobre estos compuestos es la publicada en 2018 (Wannenmacher et al., 2018). El estudio de los compuestos fenólicos en la cerveza está continuamente aportando nuevos estudios donde se detectan compuestos fenólicos que nunca antes habían sido identificados en la cerveza, prueba de ello es el estudio de Manfroi et al. publicado en 2019 en el que se observan por primera vez 12 nuevos compuestos fenólicos en cervezas.

La mayoría de los estudios recientes coinciden en que los compuestos fenólicos más abundantes en la cerveza son los ácidos ferúlico, gálico y p-cumárico, aunque

también los ácidos vanílico y sinápico se han descrito como ácidos fenólicos importantes en esta bebida (Wannenmacher et al., 2018).

El ácido ferúlico es mayoritario en cervezas de origen europeo (Dvořáková et al., 2007; Piazzon et al., 2010), chino (Chen et al., 2010; Zhao et al., 2010) y chileno (Galarce et al., 2018), pero no lo es en cervezas brasileñas o serbias (Mitić et al., 2014) donde el ácido gálico es el mayoritario (Moura et al., 2016).

Se ha observado que el ácido sinápico está presente en altas concentraciones en cervezas europeas (Piazzon et al., 2010) pero no ha sido observado en cervezas brasileñas (Moura et al., 2016) esto se puede deber al tipo de materia prima utilizada.

Atendiendo al tipo de cervezas, en las tipo ale, es el ácido cafeico el que se encuentra en mayor proporción (Marques et al., 2017) y en cervezas tipo lager es el ácido gálico (Zhao et al., 2010). El ácido ferúlico es el mayoritario en cervezas sin alcohol, negras, de tipo abadía, de trigo, pilsen y bock (Granato et al., 2011; Piazzon et al., 2010)

El xanthohumol es uno de los antioxidantes más importantes por los efectos que tiene en la salud, llegándose a detectar concentraciones entre 0,002 mg/L y 0,628 mg/L (Chen et al., 2010). El resveratrol, otro polifenol de gran interés, se encuentra en menor proporción en las cervezas lager que en las cervezas de tipo ale, (abadía weissbier o stout) (Molina et al., 2011).

3.3. Cuantificación de melanoidinas.

La forma de cuantificar el contenido en melanoidinas requiere de tres pasos, primeramente se debe llevar a cabo una extracción, seguida de una ultracentrifugación para posteriormente liofilizar la solución. Los niveles totales de melanoidinas se obtienen a partir del extracto sólido pardo amarillento obtenido (Pastoriza et al., 2014; Rivero et al., 2005; Zhao et al., 2013).

El contenido de melanoidinas en la cerveza está muy influenciado por los factores genéticos de sus materias primas y por el método de elaboración empleado (Rivero et al., 2005; Zhao et al., 2013). Este contenido depende del tipo de cerveza, los valores más altos se encontraron en cervezas negras (1,49 g/L), valores que casi triplican a los encontrados en cervezas rubias (0,61 g/L) o cervezas sin alcohol (0,58 g/L) (Langner et al., 2014, Rivero et al., 2005). La cerveza tipo pilsen, por ejemplo, tiene un contenido en melanoidinas de entre 8,7% y 10,3% (Pastoriza et al., 2014; Zhao et al., 2013).

3.4. Cuantificación de sulfitos.

El nivel de sulfitos en la cerveza se puede cuantificar mediante numerosas técnicas, entre las que se incluyen: técnicas electroquímicas, fluorometría, quimioluminiscencia, colorimetría, cromatografía de gases, biosensores y cromatografía de líquidos (Guido, 2016; Hoff et al., 2013; Ruiz et al., 2009; Zhao et al., 2006).

Los dos métodos aceptados por organismos internacionales para medir sulfitos en cerveza son el método de destilación (método de Monier-Williams) recomendado por la EBC, la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) y el Institute of Brewing and Distilling (IBC) y el método de la p-rosanilina recomendado por la American Society of Brewing Chemists (ASBC) y el IBC (Martínez et al., 2010). Pese a que son los recomendados, estos métodos resultan lentos y tediosos, además en ellos se utilizan reactivos que requieren especial precaución, por ello se están buscando alternativas (Abrahamsson et al., 2013).

Una de estas alternativas consiste en realizar reacciones de derivatización utilizando el reactivo ThioGlo I (Figura 6) para obtener compuestos fluorescentes y, posteriormente, mediante HPLC en fase inversa detectar los compuestos fluorescentes (Abrahamsson et al., 2013). El límite de cuantificación fue de 0,6 mg sulfito/L y el método puede ser utilizado para la cuantificación de sulfito en cervezas muy coloreadas.

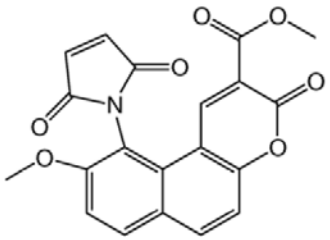


Figura 6. Reactivo ThioGlo I utilizado como reactivo derivatizante.

Recientemente se ha desarrollado un analizador fotométrico discontinuo y automatizado que permite cuantificar en 3 minutos los sulfitos presentes en la cerveza (Vervoort et al., 2019).

La utilización de electrodos de carbono serigrafiados permite cuantificar el sulfito total en cerveza y los resultados son comparables al método de referencia establecido por la EBC. Esta metodología es muy ventajosa debido a su simplicidad, bajo coste y rapidez, manteniendo al mismo tiempo gran precisión (Ramos et al., 2017).

Las concentraciones totales de SO_2 en cerveza determinadas por el método de p-rosanilina y por un método cronopotenciométrico estaban en el rango entre 0 y 37 mg/L (Dvořák et al., 2006; Zhao et al., 2013). Almeida et al., (2003) encontraron que los niveles de dióxido de azufre libre y total en las cervezas determinados por métodos voltamétricos se encontraban en los rangos de 0–3,0 mg/L y 8,1–14,3 mg/L respectivamente.

Si a la cerveza se le añaden sustancias como caramelo, la concentración de sulfito disminuye como consecuencia de un aumento de los radicales superóxido e hidroxilo en la cerveza (Noddekaer et al., 2007).

Además, las cervezas de tipo lager contienen niveles sustancialmente más altos de SO_2 que las cervezas ale porque las cepas de levadura empleadas en la elaboración de la cerveza lager producen más SO_2 que las cepas empleadas en la cerveza ale (Zhao, 2014).

4. Medida de la actividad antioxidante.

El poder reductor está generalmente asociado con la actividad antioxidante y puede servir como indicador significativo de dicha actividad. Algunos compuestos muestran actividad antioxidante a través de la quelación de iones metálicos. Incluso una cantidad mínima de iones metálicos, como el hierro o el cobre, pueden inducir al oxígeno molecular a formar especies reactivas de oxígeno que participan en la oxidación de la cerveza y dan lugar a un sabor desagradable (Zhao, 2014).

Existen varios métodos descritos en la literatura para la medida de la actividad antioxidante, si se atiende al tipo transferencia de átomos de hidrógeno o electrones:

- Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), de acuerdo a la reacción:

$$R'XH + R\bullet \longrightarrow R'X\bullet + RH$$

- Métodos basados en reacciones de reducción donde se produce una transferencia de electrones (SET).

$$R'XH + R\bullet \longrightarrow R'XH^{+}\bullet + R^{-}$$

Los métodos que se han utilizado en cervezas se recogen en el Anexo II, aunque los métodos que se utilizan con mayor frecuencia son los que involucran técnicas analíticas de espectrometría como DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity assay), ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation scavenging activity assay) o TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), ORAC (Oxygen radical-absorbing capacity assay),

FRAP (Ferric-reducing antioxidant power assay) o TRAP (Total radical trapping antioxidant parameter) debido a su sensibilidad y a sus reducidos tiempos de ensayo (Zhao, 2014).

Existen otros métodos al margen de los anteriores, reflejados en el Anexo II, que también se han utilizado para el análisis de la actividad antioxidante en cervezas y serían los ensayos de actividad quelante de metales (MCA), la quimioluminiscencia mejorada (ECL) y la resonancia de spin electrónico (ESR) (Zhao, 2014).

4.1. Actividad antioxidante de la cerveza.

La actividad antioxidante es posible medirla en las materias primas, como es la cebada utilizando los métodos ABTS y DPPH. Es posible establecer diferencias en la actividad antioxidante en función de los años de cosecha o del empleo de fertilizantes con Zn^{2+} ya que el empleo de este tipo de fertilizantes reduce la actividad antioxidante (Malachová et al., 2016). La actividad antioxidante puede verse influida también por el contenido en proteína, en general, cuanto mayor sea este contenido, menor se espera que sea la actividad antioxidante (Malachová et al., 2016). La materia prima y el proceso de elaboración de la cerveza tienen una influencia significativa en la actividad de captación de radicales DPPH en la cerveza (Mitić et al., 2014). Hay una ligera pérdida en la actividad antioxidante durante el proceso de elaboración de cerveza al pasar de mosto dulce hasta cerveza como consecuencia de la perdida de fenoles durante el proceso de fermentación (Ceccaroni et al., 2019).

La actividad antioxidante se expresa generalmente como equivalentes de trolox (TE) por litro, (mmol TE/L). Cuando se utiliza el método, ABTS, DPPH, los valores obtenidos no necesariamente han de ser iguales pese a que se utilicen las mismas unidades y esto se debe a la diferente cinética de reacción entre los fenoles y el catión ABTS o radical DPPH (Abramovič et al., 2017).

Utilizando el método FRAP (Piazzon et al., 2010) se ha demostrado que existen diferencias significativas entre los distintos tipos de cervezas (Pastoriza et al.,2014; Ribeiro et al., 2010; Zhao et al., 2013; Zhao, 2014), estableciéndose un orden decreciente en la actividad antioxidante similar al del contenido total de fenoles y que es el siguiente:

oscura>ale>trigo>lager>sin alcohol.

Independientemente del método utilizado, los niveles más bajos de actividad antioxidante se encuentran en cervezas sin alcohol y los más altos en cervezas oscuras

(Fegredo et al., 2010; Mitić et al., 2014; Piazzon et al., 2010; Ribeiro et al., 2010). Esa alta actividad antioxidante en cervezas oscuras se puede deber a las maltas especiales utilizadas, como las maltas caramelo o maltas de diferentes coloraciones. Durante el proceso de cocción de dichas maltas, se generan diferentes compuestos de Maillard que tienen actividad antioxidante (Koren et al., 2017).

Los compuestos fenólicos son los compuestos antioxidantes más importantes presentes en la cerveza, ya que por sí solos contribuyen del 50% al 80% de la actividad antioxidante total de esta bebida. Los compuestos con estructura flavonoide, como la (+) catequina, generalmente muestran una mayor actividad antioxidante que los compuestos no flavonoides, como los ácidos fenólicos, estilbenos o cumarinas. La actividad antioxidante de los flavonoides depende de su estructura molecular, en particular de la posición y número de grupos hidroxilo, y de dobles enlaces (Humia et al., 2019). Por lo tanto, es posible incrementar la actividad antioxidante de la cerveza si se aumentan los niveles de compuestos fenólicos, particularmente flavonoides y algunos ácidos fenólicos (Ceccaroni et al., 2019; Humia et al., 2019; Zhao et al., 2013). Las cervezas con alto contenido de ácido cafeico son las de mayor actividad de captación de radicales, (Aron et al., 2010).

Por regiones, las cervezas belgas suelen tener mayor actividad antioxidante que las portuguesas (Ribeiro et al., 2010). También se ha visto que para cervezas asiáticas se obtiene un valor de FRAP menor que para cervezas inglesas o alemanas, esto se debe a que generalmente las cervezas asiáticas son menos amargas (Fegredo et al., 2010). Las cervezas amargas tienen mayor actividad antioxidante, el amargor procede del lúpulo y este es el responsable de que ciertos compuestos fenólicos como procianidinas, epicatequinas o ácido ferúlico se liberen durante la elaboración de las cerveza haciendo que la actividad antioxidante aumente (Fegredo et al., 2010). El principal mecanismo por el cual los ácidos derivados del lúpulo actúan como antioxidantes es por quelación de hierro y por captación de radicales (Kunz et al., 2014).

En un estudio publicado en 2017 por Marques et al. en el que se analizó la actividad antioxidante de 4 cervezas distintas tipo ale utilizando el método DPPH, se demostró que eran capaces de inhibir del 29,4 al 48,5% de los radicales libres. Estos valores están en línea con los descritos por Granato et al. en 2011, quienes encontraron valores del 4,75 a 59,98% para la inhibición de radicales libres empleando también el método DPPH para cervezas comerciales brasileñas.

Por otro lado, se ha demostrado que existe una correlación entre los contenidos de melanoidinas y la actividad de captación de radicales del DPPH, el poder reductor y

la quelación de metales, lo que sugiere que las melanoidinas pueden contribuir de manera muy significativa a la actividad antioxidante de las cervezas (Zhao et al., 2013).

El uso de aditivos, como edulcorantes, saborizantes o antioxidantes hacen que la actividad antioxidante aumente respecto a la misma cerveza sin esos aditivos (Ribeiro et al., 2010).

Cabe destacar que la actividad antioxidante de la cerveza es similar a la de otras bebidas alcohólicas de gran consumo, como los vinos blancos y rosados, el whisky o el coñac (Moura et al., 2016).

5. Nuevas alternativas para incrementar la actividad antioxidante en la cerveza.

A la vista de los beneficios que proporcionan los antioxidantes en la cerveza, cada vez son más los trabajos orientados a incrementar el contenido de los mismos, dando lugar a su vez a la obtención de nuevas cervezas.

Una posibilidad que existe para conseguir este incremento consiste en utilizar maltas de arroz para la elaboración de la cerveza. El contenido total de fenoles para esta cerveza es de 228 mg GAE/L y además los resultados de los estudios FRAP, DPPH y ABTS para la cerveza de malta de arroz muestran una actividad antioxidante que es comparable con la cerveza de malta de cebada (Ceccaroni et al., 2019), concretamente la cerveza tipo lager (Zhao et al., 2010).

Tabla 1. Comparación de la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles entre las cervezas elaboradas a partir de maltas de cebada y maltas de arroz.

	Actividad antioxidante			Fenoles
	FRAP (µmmol TE/L)	DPPH (µmmol TE/L)	ABTS (µmmol TE/L)	TPC (mg GAE/L)
Cervezas de malta de cebada[1]	121-533	240-2000	550-1950	152-339 (lager)[2]
Cervezas de malta de arroz[1]	422	517	2860	228

1. Ceccaroni et al., 2019; 2. Zhao et al., 2010

A las cervezas de arroz se las puede incorporar plantas, en especial *A. heterophyllus, C. extensa* , *O. corymbosa y A. malaccensis*, porque tienen una actividad antioxidante demostrada (Das et al., 2016). Otra planta que se puede utilizar es *Lycium*

ruthenicum como fuente de proantocianidinas y en cervezas tipo lager se ha visto que aumenta la concentración de este tipo de polifenoles hasta un 290%, incrementando así el contenido de fenoles totales (Zhao, et al., 2017).

Por otro lado, el empleo de kéfir durante la fermentación de la cerveza proporciona cervezas con una composición de fenoles similar a la de las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta cerveza de kéfir la primera producida por probióticos como único fermentador, además al kéfir se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Rodrigues et al., 2016).

El enriquecimiento de la cerveza con frutas o zumos de frutas pueden darle nuevos sabores y también puede aumentar las concentraciones de sus compuestos bioactivos. Una posible fruta a incorporar es la cereza de Cornalina, el empleo de su zumo puede llegar a duplicar el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante medida con los métodos DPPH, ABTS y FRAP (Kawa et al., 2019). La incorporación de membrillo en cerveza aumenta el contenido de fenoles en la misma (Zapata et al., 2019). Otra posibilidad es elaborar cerveza con cítricos como el caqui o las bayas goji, con el consiguiente incremento en el contenido total de fenoles (Koren et al., 2017) resultando el caqui una buena alternativa. Esta cerveza, de caqui, tiene 714 GAE mg/L y puede inhibir hasta un 40,00% de los iones O_2^{-3} y un 40,11% de los OH^- mientras que la misma cerveza sin la adición del zumo de caqui presenta 507 GAE mg/L y la inhibición solo alcanza el 21,07% de los iones O_2^{-3} y un 24,00% de los OH^- (Cho et al., 2018). El empleo de las bayas Goji también incrementa el valor de TPC desde los 335 GAE mg/L hasta los 623 GAE mg/L así como la ORAC (8,87 a 16,84 mmol TE/L) (Ducruet et al., 2017).

El própolis es un producto natural que tiene un gran potencial como aditivo alimentario funcional debido a sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas y ya se ha utilizado en cervezas para aumentar el contenido total de fenoles (Ulloa et al., 2017).

Otras posibilidades que permiten incrementar la actividad antioxidante en la cerveza son: aumentar el contenido en isoxanthohumol mediante el uso de lúpulos biológicamente activos (Protsenko et al., 2018), adicionar xanthohumol (Wunderlich et al., 2013) o melatonina en la cerveza (Garcia et al., 2013).

Atendiendo al proceso de elaboración más que a los ingredientes, un método novedoso consiste en el uso de la cavitación hidrodinámica que permite retener o generar una mayor concentración de xanthohumol, desmetilxanthohumol y 6-geranilnaringenina (Ciriminna et al., 2018). También es posible aprovechar los restos de

levadura utilizados en la elaboración para ser utilizados como fuente de fenoles (León et al., 2018).

Por último, el mundo vitivinícola y el cervecero en ocasiones se entrelazan para dar productos de mayor calidad, de una de esas uniones surge el empleo de barricas de vino durante el proceso de elaboración de la cerveza para aumentar el contenido en fenoles totales y la actividad antioxidante (Sanna et al., 2015), y el empleo de mosto de uva con la misma finalidad (Veljovic et al., 2010).

El empleo de nuevos ingredientes en la elaboración de la cerveza permite aprovecharse de las propiedades de dichos ingredientes y elaborar nuevas cervezas cuyas propiedades antioxidantes se vean mejoradas respecto a las cervezas convencionales. Los datos obtenidos de los análisis sensoriales de estas nuevas cervezas son satisfactorios (Ceccaroni et al., 2019) lo cual indica que habría potenciales consumidores de estos nuevos productos. Por otro lado los procesos industriales para la elaboración de estas cervezas son compatibles con los que hay actualmente y no supondrían un gasto excesivo para las compañías cerveceras.

6. Conclusiones.

1. Los compuestos antioxidantes presentes en la cerveza tienen una gran importancia a nivel biológico aunque la biodisponibilidad de alguno de ellos es cuestionable.
2. La cerveza presenta 3 grupos de antioxidantes endógenos, los fenoles, las melanoidinas y los sulfitos, siendo de mayor importancia los primeros.
3. Las cervezas sin alcohol presentan menor contenido fenólico que las cervezas con alcohol. Aunque dicho contenido depende en gran medida de la técnica de elaboración empleada para la fabricación de la cerveza sin alcohol. Las cervezas elaboradas con zumos de fruta presentan mayor concentración de fenoles.
4. Los métodos de detección de fenoles están en continua mejora, prueba de ello es que se están encontrando nuevos polifenoles nunca antes descritos en cervezas.
5. Los ácido cafeico, ferúlico, gálico y p-cumárico se han descrito como los principales ácidos fenólicos presentes en la cerveza. Depende mucho del origen geográfico, materias primas y tipo de cerveza el que predominen unos u otros.
6. Las cervezas oscuras y las artesanas, presentan una actividad antioxidante elevada que es debida al empleo de maltas especiales que durante la cocción generan compuestos con actividad antioxidante.
7. Existe una tendencia a elaborar nuevas cervezas que mejoren las propiedades antioxidantes de las actuales ya sea con modificaciones de los ingredientes o modificaciones en el proceso de elaboración.

7. Bibliografía.

Abrahamsson, V., Hoff, S., Lund, M. N., Andersen, M. L., & Nielsen, N. J. (2013). Determination of Sulfite in Beer Based on Fluorescent Derivatives and Liquid Chromatographic Separation. *Cerevisia*, *38*(2), 60. https://doi.org/10.1016/j.cervis.2013.09.038

Abramovič, H., Grobin, B., Poklar Ulrih, N., & Cigić, B. (2017). The Methodology Applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteau Assays Has a Large Influence on the Determined Antioxidant Potential. Acta Chimica Slovenica, 64(2), 491–499. https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3408

Agbor, G., Vinson, J., & Donnelly, P. (2014). Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, (December), 147–156. https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028

Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., & Pagliaro, M. (2018). Innovative beer-brewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. *Journal of Cleaner Production*, *171*, 297–311. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.027

Almeida, P., Rodrigues, J., Guido, L., Santos, J., Barros, A., & Fogg, A. (2003). Free Sulfur Dioxide in Beer as the Difference Between Total Sulfur Dioxide and Acetaldehyde: A Voltammetric Approach. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 0470, 191–195. https://doi.org/10.1094/asbcj-61-0191

Aron, P. M., & Shellhammer, T. H., (2011). A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 369–380. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x

Arranz, S., Chiva, G., Valderas, P., Medina, A., Lamuela, R. M., & Estruch, R. (2012). Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*, *4*(7), 759–781. https://doi.org/10.3390/nu4070759

Callemien, D., & Collin, S. (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International*, *26*(1), 1–84. https://doi.org/10.1080/87559120903157954

Cardona, F., Andrés, C., Tulipani, S., Tinahones, F., & Queipo, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1415–1422. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001

Carvalho, D. O., Correia, E., Lopes, L., & Guido, L. F. (2014). Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt. *Food Chemistry*, *160*, 127–133. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.074

Ceccaroni, D., Sileoni, V., Marconi, O., De Francesco, G., Lee, E. G., & Perretti, G. (2019). Specialty rice malt optimization and improvement of rice malt beer aspect and aroma. *Food Science and Technology*, *99*, 299–305. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.060

Cerrato, M., Bernalte, E., Bernalte, M. J., & Pinilla, E. (2019). Fast and direct

amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors. *Talanta*, *193*(April 2018), 93–99. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.093

Chen, L., Zhao, Q., Jin, H., Zhang, X., Xu, Y., Yu, A., Zhang, H., & Ding, L. (2010). Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. Talanta, 81(1–2), 692–697. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.004

Chen, O., & Blumberg, J. (2010). *Flavonoids in Beer and Their Potential Benefit on the Risk of Cardiovascular Disease*. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00084-5

Chiva, G., Magraner, E., Condines, X., Valderas, P., Roth, I., Arranz, S., Casas, R., Navarro, M., Hervas, A., Sisó, A., Martínez, M., Vallverdú, A., Quifer, P.Lamuela, R.M., & Estruch, R. (2014). Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 25(1), 36–45. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.07.008

Chiva, G., Urpi, M., Rotchés, M., Zamora, R., Llorach, R., Lamuela, R. M., Zamora, R., Llorach, R., Lamuela, R.M.,Estruch, R., & Andrés, C. (2011). Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218(5), 698–705. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.012

Cho, J. H., Kim, I. D., Dhungana, S. K., Do, H. M., & Shin, D. H. (2018). Persimmon fruit enhanced quality characteristics and antioxidant potential of beer. *Food Science and Biotechnology*, *27*(4), 1067–1073. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0340-2

Ciriminna, R., Albanese, L., Di Stefano, V., Delisi, R., Avellone, G., Meneguzzo, F., & Pagliaro, M. (2018). Beer produced via hydrodynamic cavitation retains higher amounts of xanthohumol and other hops prenylflavonoids. *LWT - Food Science and Technology*, *91*(August 2017), 160–167. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.037

Das, A. J., Das, G., Miyaji, T., & Deka, S. C. (2016). In Vitro Antioxidant Activities of Polyphenols Purified from Four Plant Species Used in Rice Beer Preparation in Assam India. *International Journal of Food Properties*, *19*(3), 636–651. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1038835

de Gaetano, G., Cerletti, C., Alkerwi, A., Iacoviello, L., Badimon, L., Costanzo, S., Pounis, G., Trevisan, M., Panico, S., Stranges, S., Sofi, F., Ursini, F., La Vecchia, C., Di Castelnuovo, A., Bejko, D., Donati, M.B., Chiva, G., & Estruch, R. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 26(6), 443–467. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007

Ditrych, M., Kordialik, E., & Czyzowska, A. (2015). Antiradical and reducing potential of commercial beers. *Czech Journal of Food Sciences*, *33*(3), 261–266. https://doi.org/10.17221/658/2014-CJFS

Ducruet, J., Rébénaque, P., Diserens, S., Kosińska-Cagnazzo, A., Héritier, I., &

Andlauer, W. (2017). Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food Chemistry*, *226*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.047

Dvořak, J., Dostálek, P., Štěrba, K., Čejka, P., Kellner, V., Čulík, J., & Beinrohr, E. (2006). Determination of total sulphur dioxide in beer samples by flow-through chronopotentiometry. Journal of the Institute of Brewing, 112(4), 308–313. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00736.x

Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, M., & Dostálek, P. (2007). Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech Journal of Food Sciences*, *25*(4), 182–188. https://doi.org/10.17221/690-CJFS

Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2012). Melanoidins Formed by Maillard Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews*, *4*(4), 203–223. https://doi.org/10.1007/s12393-012-9057-9

ElKaoutit, M., Naranjo, I., Temsamani, K. R., Hernández, M. P., Bellido, D., & Hidalgo, J. L. (2008). A comparison of three amperometric phenoloxidase-Sonogel-Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. *Food Chemistry*, *110*(4), 1019–1024. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.006

Elrod, S. M. (2018). Xanthohumol and the Medicinal Benefits of Beer. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 19–32). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813006-3.00003-9

Faria, M. A., Martins, Z. E., Ferreira, I., Melo, A., & Machado, J. C. (2018). Modeling of α-acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. *Food Chemistry*, *278*, 216–222. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.050

Fegredo, J. A., Meynell, R., Lai, A., Wong, M., Martin, C., Wiseman, H., & Preedy, V. R (2010). *The Antioxidant Capacity of Beer: Relationships Between Assays of Antioxidant Capacity, Color and Other Alcoholic and Non-alcoholic Beverages*. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00046-8

Ferk, F., Mišík, M., Nersesyan, A., Pichler, C., Jäger, W., Szekeres, T., Marculescu, R., Poulsen, H., Henriksen, T., Bono, R., Romanazzi, V., Al-Serori, H., Biendl, M., Wagner, K Heinz K., Michael., &Knasmüller, S. (2016). Impact of xanthohumol (a prenylated flavonoid from hops) on DNA stability and other health-related biochemical parameters: Results of human intervention trials. Molecular Nutrition and Food Research, 60(4), 773–786. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500355

Fernández, M. L., & Ruiz, A. (2014). *Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer*. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*.(pp. 289–299) Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00029-5

Fogarasi, A. L., Kun, S., Tankó, G., Stefanovits, É., & Hegyesné, B. (2015). A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chemistry*, *167*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.084

Galarce, O., Pavon, J., Aranda, M., Novoa, L., & Henriquez, K. (2018). Chemometric Optimization of QuEChERS Extraction Method for Polyphenol Determination in Beers by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Food Analytical Methods*, *12*(2), 448–457. https://doi.org/10.1007/s12161-018-1376-x

Garcia, H., Calvo, J. R., & Maldonado, M. D. (2013). High levels of melatonin generated during the brewing process. *Journal of Pineal Research*, *55*(1), 26–30. https://doi.org/10.1111/jpi.12005

García, J. J., López, D., Cubillana, L., Lete, C., Lupu, S., Palacios, J. M., & Bellido, D. (2018). Assessment of the Polyphenol Indices and Antioxidant Capacity for Beers and Wines Using a Tyrosinase-Based Biosensor Prepared by Sinusoidal Current Method. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *19*(1). https://doi.org/10.3390/s19010066

Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, *41*(13), 1941–1954. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012

Gerhäuser, C., & Becker, H. (2008). Phenolic Compounds in Beer. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 124–144). https://doi.org/10.1039/b309894j

Gorjanović, S. Ž., Novaković, M. M., Potkonjak, N. I., Ida, L. Č., & Sužnievič, D. Ž. (2010). Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 744–751. https://doi.org/10.1021/jf903091n

Granato, D., Favalli, G., Fonseca, J., & Gomez, A. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(3), 563–571. https://doi.org/10.1002/jsfa.4222

Guido, L. F. (2016). Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role. *Scientia Agricola*, *73*(2), 189–197. https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0290

Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. da C., & Padilha, F. F. (2019). Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*, *24*(8), 1568. https://doi.org/10.3390/molecules24081568

Jiang, W., Zhao, S., Xu, L., Lu, Y., Lu, Z., Chen, C., Ni, J., Wan, R., & Yang, L. (2015). The inhibitory effects of xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, on cell growth and tumorigenesis in human pancreatic cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy, 73, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.05.020

Jurić, A., Ćorić, N., Odak, A., Herceg, Z., & Tišma, M. (2015). Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions. *Journal of the Institute of Brewing*, *121*(4), 541–547. https://doi.org/10.1002/jib.254

Kawa, J., Adamenko, K., Kucharska, A. Z., Prorok, P., & Piórecki, N. (2019). Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food Chemistry*, *281*(August 2018), 147–153. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.093

Kłósek, M., Mertas, A., Król, W., Jaworska, D., Szymszal, J., & Szliszka, E. (2016). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells after treatment with xanthohumol—A natural compound present in Humulus lupulus L. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 837. https://doi.org/10.3390/ijms17060837

Koren, D., Orbán, C., Galló, N., Kun, S., Vecseri, B., & Kun, G. (2017). Folic acid content and antioxidant activity of different types of beers available in Hungarian retail. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(5), 1158–1167. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2503-1

Kunz, T., Frenzel, J., Wietstock, P. C., & Methner, F. J. (2014). Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. *Journal of the Institute of Brewing*, *120*(4), 415–425. https://doi.org/10.1002/jib.162

Langner, E., & Rzeski, W. (2014). Biological properties of melanoidins: A review. *International Journal of Food Properties*, *17*(2), 344–353. https://doi.org/10.1080/10942912.2011.631253

León, M. E., Gómez, E., Rosales, N., & Madrid, Y. (2018). Residual brewing yeast as a source of polyphenols: Extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools. *Food Chemistry*, *267*, 246–254. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.141

Luescher, S., Urmann, C., & Butterweck, V. (2017). Effect of Hops Derived Prenylated Phenols on TNF-α Induced Barrier Dysfunction in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Natural Products*, *80*(4), 925–931. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00869

Malachová, A., Cerkal, R., Hampel, D., Neuwirthová, J., Mareček, V., Mikyška, A., & Čejka, P. (2016). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, *73*, 40–45. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004

Manfroi, V., Cheiran, K. P., Rodrigues, E., Anzanello, M. J., Raimundo, V. P., Frazzon, J., & Kahmann, A. (2019). Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.198

Margo A, D. (2000). Southwestern Internal Medicine Conference. *The Journal of Urology*, *320*(5), 320–326. https://doi.org/10.1097/00005392-199802001-00027

Marova, I., Parilova, K., Friedl, Z., Obruca, S., & Duronova, K. (2011). Analysis of phenolic compounds in lager beers of different origin: A contribution to potential determination of the authenticity of Czech beer. *Chromatographia*, *73*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1007/s10337-011-1916-7

Marques, D., Cassis, M., Quelhas, J., Bertozzi, J., Visentainer, J., Oliveira, C., & Monteiro, A. (2017). Characterization of Craft Beers and their Bioactive Compounds. *Chemical Engineering Transactions*, *57*, 1747–1752. https://doi.org/10.3303/CET1757292

Martínez, E; Hernández, M. P. Palacios, J. M., ElKaoutit, M., Naranjo, I., & Bellido, D. (2010). Estimation of beer stability by sulphur dioxide and polyphenol determination.

Evaluation of a Laccase-Sonogel-Carbon biosensor. *Food Chemistry*, *127*(1), 234–239. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.097

Martins, S., Jongen, W., & can Boekel, M. (2012). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, *11*, 364–373. https://doi.org/10.1515/9783110973976.218

Miranda, C. L., Elias, V. D., Hay, J. J., Choi, J., Reed, R. L., & Stevens, J. F. (2016). Xanthohumol improves dysfunctional glucose and lipid metabolism in diet-induced obese C57BL/6J mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *599*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.008

Mitić, S., Paunović, D., Pavlović, A., Tošić, S., Stojković, M., & Mitić, M. (2014). Phenolic profiles and total antioxidant capacity of marketed beers in Serbia. *International Journal of Food Properties*, *17*(4), 908–922. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.680223

Molina, L., Ruiz, A., Fernández, & Luisa, M. (2011). A novel multicommuted fluorimetric optosensor for determination of resveratrol in beer. *Talanta*, *83*(3), 850–856. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.033

Monteghirfo, S., Tosetti, F., Ambrosini, C., Stigliani, S., Pozzi, S., Frassoni, F., Fassina, G., Soverini, S., Albini, A., & Ferrari, N. (2008). Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl-transformed cells involve nuclear factor- B and p53 modulation. Molecular Cancer Therapeutics, 7(9), 2692–2702. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-08-0132

Moreno, I. (2017). Beneficios de los polifenoles contenidos en la cerveza sobre la microbiota intestinal. *Nutricion Hospitalaria*, *34*, 41–44. https://doi.org/10.20960/nh.1570

Moura, N., Cazaroti, T., Dias, N., Fernandes, P., Monteiro, M., Perrone, D., & Guedes, A. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *199*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133

Navarro, G., Martínez, E., Ortiz, R., Noé, V., Ciudad, C. J., & Franco, R. (2018). Resveratrol and Related Stilbenoids, Nutraceutical/Dietary Complements with Health-Promoting Actions: Industrial Production, Safety, and the Search for Mode of Action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(4), 808–826. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12359

Noddekaer, T., & Andersen, M., (2007). Effects of Maillard and Caramelization Products on Oxidative Reactions in Lager Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *0470*, 15–20. https://doi.org/10.1094/asbcj-2007-0112-02

Pai, T., Sawant, S., Ghatak, A., Chatuverdi, P., Gupte, A., & Desai, N. (2013). Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(3), 1414–1423. https://doi.org/10.1007/s13197-013-1152-2

Pastoriza, S., & Rufián, J. A. (2014). Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chemistry*, *164*(April), 438–445.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.118

Pérez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*, 112–120. https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221

Perretti, G., Russo, P., Di Matteo, M., Liguori, L., De Francesco, G., & Albanese, D. (2015). Production and characterization of alcohol-free beer by membrane process. *Food and Bioproducts Processing*, *94*, 158–168. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.03.003

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*(19), 10677–10683. https://doi.org/10.1021/jf101975q

Pietro, M. B., & Bamforth, C. W. (2012). A Comparison of the Antioxidant Potential of Wine and Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(4), 547–555. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00503.x

Protsenko, L., Vlasenko, A., Ovadenko, O., Litvynchuk, S., Rudyk, R., Protsenko, A., & Hryniuk, T. (2018). Beer enrichment with biologically active hop compounds. *Ukrainian Food Journal*, *7*(1), 65–78. https://doi.org/10.24263/2304-974x-2018-7-1-7

Quifer, P., Martínez, M., Jáuregui, O., Estruch, R., Lamuela, R., Chiva, G., & Vallverdú-Queralt, A. (2014). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, *169*, 336–343. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154

Ramos, R. M., Brandão, P. F., Gonçalves, L. M., Vyskočil, V., & Rodrigues, J. A. (2017). Electrochemical sensing of total sulphites in beer using non-modified screen-printed carbon electrodes. *Journal of the Institute of Brewing*, *123*(1), 45–48. https://doi.org/10.1002/jib.402

Redondo, N., Nova, E., Díaz, L. E., & Marcos, A. (2018). Effects of moderate beer consumption on health. *Nutrición Hospitalaria*, *35*(6), 41–44. https://doi.org/10.20960/nh.2286

Ribeiro, P. A., Barbosa, R., Delerue, C. M., & Goreti, M. (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*, *43*(6), 1702–1709. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.014

Rivero, D., Pérez, S., González, M. L., Valls, V., Codoñer, P., & Muñiz, P. (2005). Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3637–3642. https://doi.org/10.1021/jf048146v

Rodrigues, K., Araújo, T. H., Schneedorf, J. M., de Souza, C., de Oliveira, G., Sinigaglia, R., & Rodrigues, M. R. (2016). A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. *Journal of Functional Foods*, *21*, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035

Ruiz, C., & Jiménez, F. (2009). Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review. *Food Chemistry*, *112*(2), 487–493. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.085

Russo, P., Liguori, L., Albanese, D., Crescitelli, A., & Di, M. (2013). Investigation of Osmotic Distillation Technique for Beer Dealcoholization. *Chemical Engineering Transactions*, *32*(January), 1735–1740. https://doi.org/10.3303/CET1332290

Sánchez, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros, L., & Jacobo, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, *5*(21), 5990–5999. https://doi.org/10.1039/c3ay41125g

Sandoval, B. A., Lamuela, R., Estruch, R., Sasot, G., Doménech, M., & Tresserra, A (2017). Beer Polyphenols and Menopause: Effects and Mechanisms—A Review of Current Knowledge. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2017/4749131

Sanna, V., & Pretti, L. (2015). Effect of wine barrel ageing or sapa addition on total polyphenol content and antioxidant activities of some Italian craft beers. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*(3), 700–707. https://doi.org/10.1111/ijfs.12666

Socha, R., Pająk, P., Fortuna, T., & Buksa, K. (2017). Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. International Journal of Food Properties, 20(1), 595–609. https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1306550

Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Rezaei, K. (2012). Health-related aspects of beer: A review. *International Journal of Food Properties*, *15*(2), 350–373. https://doi.org/10.1080/10942912.2010.487627

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*, *2017*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2017/6716053

Veljovic, M., Djordjevic, R., Leskosek, I., Lakic, N., Despotovic, S., Pecic, S., & Nedovic, V. (2010). The possibility of producing a special type of beer made from wort with the addition of grape must. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 440–444. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00795.x

Vervoort, Y., Wiederkehr, R. S., Smets, M., Fauvart, M., Lagae, L., Verstrepen, K. J., & Stakenborg, T. (2019). Development and validation of a glass-silicon microdroplet-based system to measure sulfite concentrations in beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1516-6

Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, *128*(3), 573–584. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.075

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*(4),

953–988. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352

Wunderlich, S., Wurzbacher, M., & Back, W. (2013). Roasting of malt and xanthohumol enrichment in beer. *European Food Research and Technology*, *237*(2), 137–148. https://doi.org/10.1007/s00217-013-1970-5

Zamudio, Y., Scanu, A., Spinella, P., Oliviero, F., & Punzi, L. (2017). Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(5), 1653–1659. https://doi.org/10.1002/jsfa.8664

Zapata, P. J., Martínez, A., Gironés, A., Santos, D., Noguera, L., & Carbonell, Á. A. (2019). Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *Lwt*, *103*, 139–146. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.002

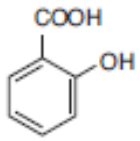
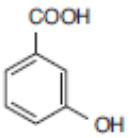
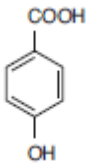
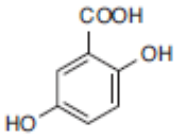
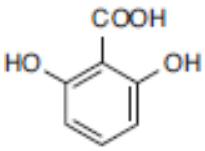
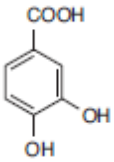
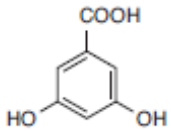
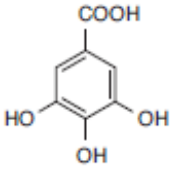
Zhao, H. (2014). Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (pp. 15–24). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00002-7

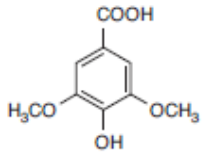
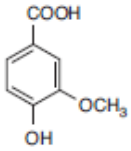
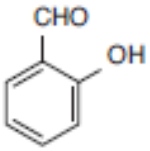
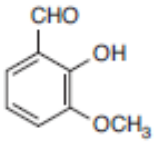
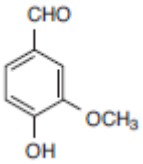
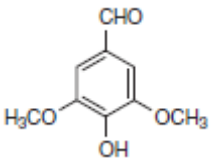
Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, *119*(3), 1150–1158. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028

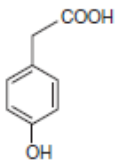
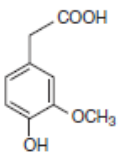
Zhao, H., Li, H., Sun, G., Yang, B., & Zhao, M. (2013). Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(4), 910–917. https://doi.org/10.1002/jsfa.5824

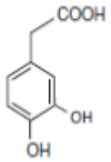
Zhao, M., Hibbert, D. B., & Gooding, J. J. (2006). Determination of sulfite in beer samples using an amperometric fill and flow channel biosensor employing sulfite oxidase. *Analytica Chimica Acta*, *556*(1), 195–200. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.083

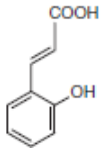
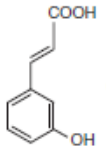
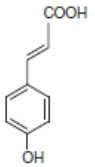
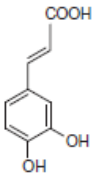
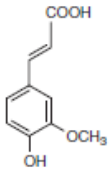
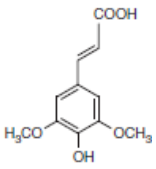
Anexo I. Fenoles con actividad antioxidante presentes en la cerveza.

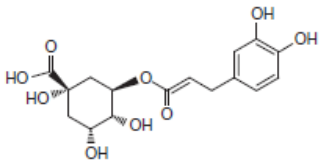
Derivados del ácido benzoico	
Estructura	**Nombre**
	Ácido salicílico
	Ácido m-hidroxibenzoico
	Ácido p-hidroxibenzoico
	Ácido gentísico
	γ-Resorcílico
	Ácido protocatecuico
	α-Resorcílico
	Ácido gálico

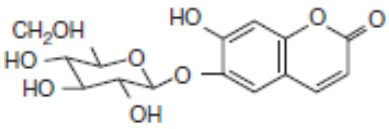
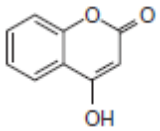
	Ácido siríngico
	Ácido vanílico
	Salicilaldehído
	o-Vaninila
	Vanilina
	Siringaldehído

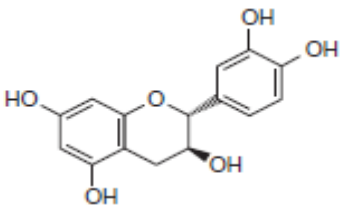
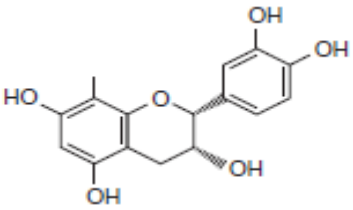
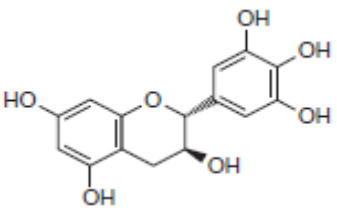
Derivados del ácido fenilacético	
Estructura	**Nombre**
	Ácido 4-hidroxifenilacético
	Ácido homovanílico

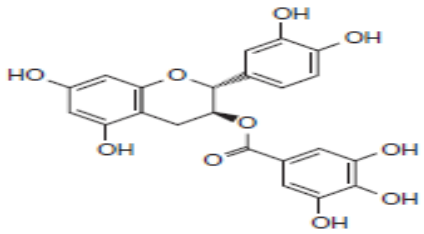
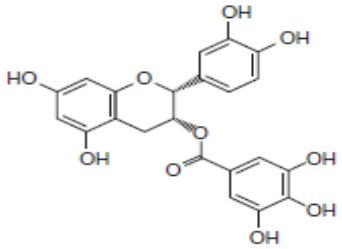
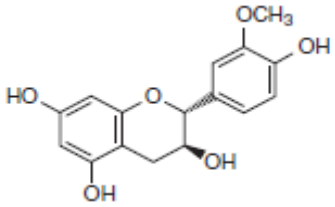
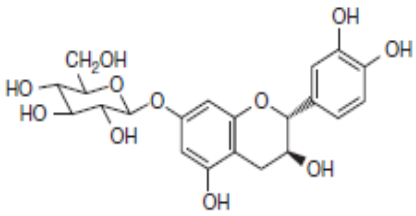
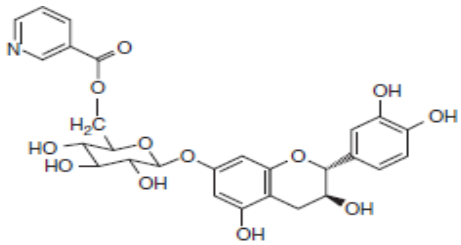
	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

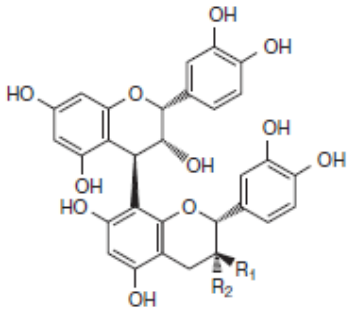
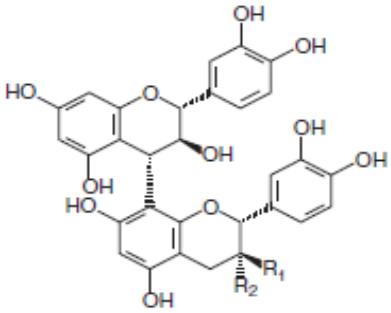
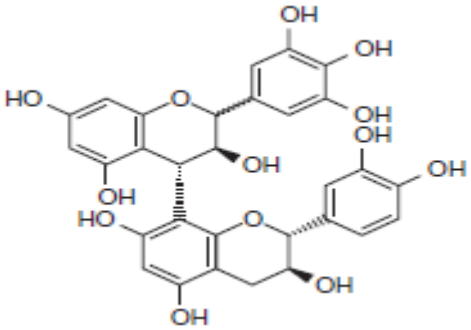
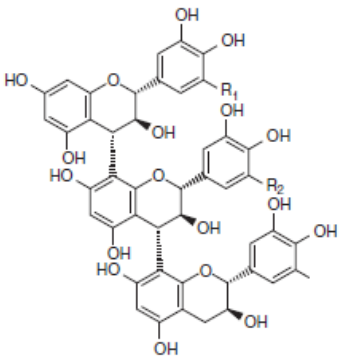
Derivados del ácido cinámico	
Estructura	**Nombre**
	o-Ácido cumárico
	m-Ácido cumárico
	p-Ácido cumárico
	Ácido cafeico
	Ácido ferúlico
	Ácido sinápico

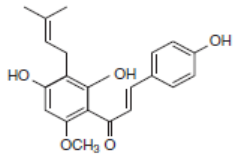
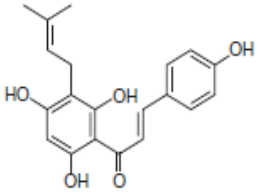
	Ácido clorogénico

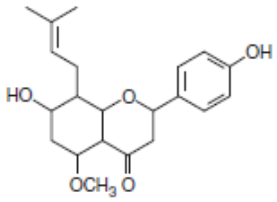
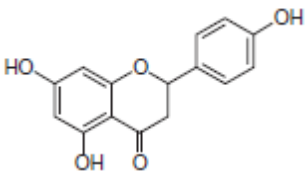
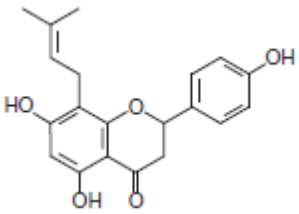
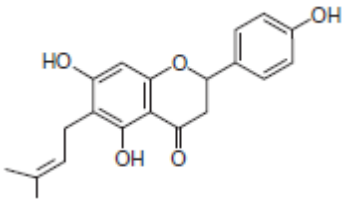
Cumarinas	
Estructura	**Nombre**
	Esculina
	4-Hidroxicumerina

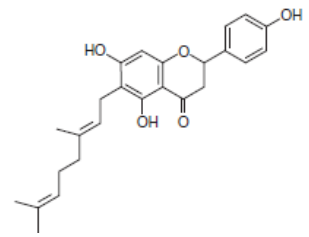
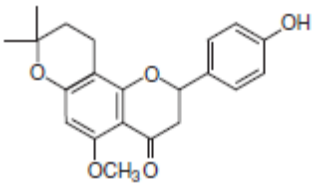
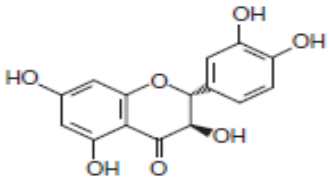
Flavan-3-oles (catequinas)	
Estructura	**Nombre**
	(+) Catequina
	(-) Catequina
	Galocatecol

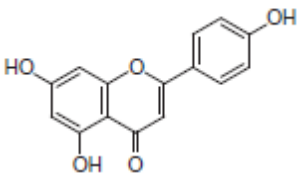
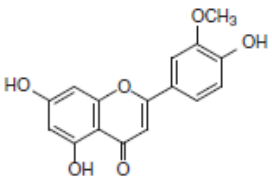
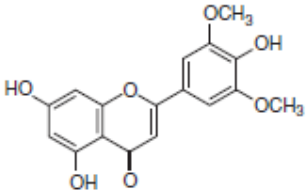
	Galato de catequina
	Galato de epicateina
	3-*O*-metilcatequina
	Catequina-7-O-β-glucopiranosido
	Catequina 7-O-β (6''-*O*-nicotinoil)-β-*d*-glucopiranosido

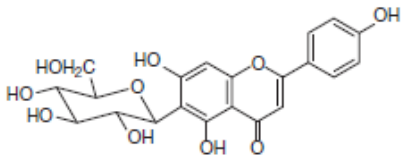
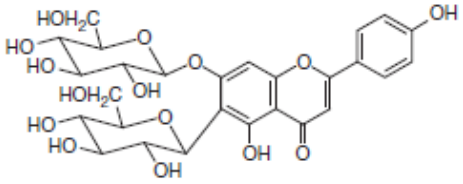
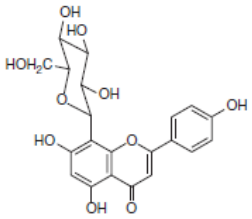
Proantocianinas	
Estructura	**Nombre**
	$R_1 = OH, R_2 = H$ Procianidina B1 $R_1 = H, R_2 = OH$ Procianidina B2
	$R_1 = OH, R_2 = H$ Procianidina B3 $R_1 = H, R_2 = OH$ Procianidina B4
	Prodelfinidina B3 Prodelfinidina B9
	$R_1 = R_2 = H$ Procianidina C2 $R_1 = R_2 = OH$ Prodelfinidina C2

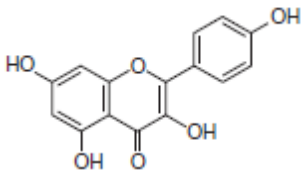
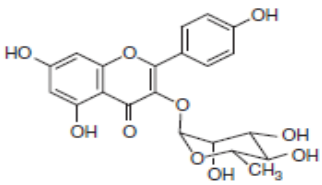
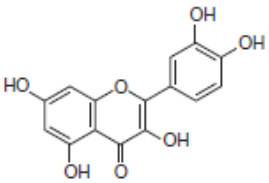
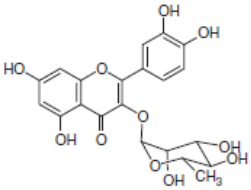
Chalconas	
Estructura	**Nombre**
	Xanthohumol
	Desmetillxanthohumol

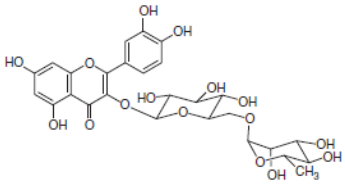
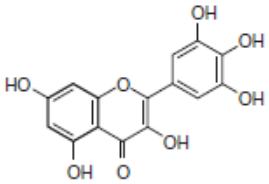
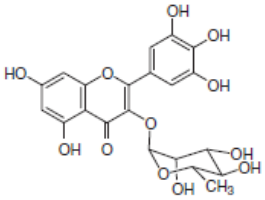
Flavanonas	
Estructura	**Nombre**
	Isoxanthohumol
	Naringenina
	8-Prenilnaringenina
	6-Prenilnaringenina

	6-Geranilnaringenina
	5-Metill-6-dimetil-4,5 dihidropirano[2,3,7,8]naringenina
	Taxifolina

Flavonas	
Estructura	**Nombre**
	Apigenina
	Crioseriol
	Tricina

	Isovitexina
	Saponarin
	Vitexina

Flavonoles	
Estructura	**Nombre**
	Kaempferol
	Afzelin
	Quercetina
	Quercetina (quercetina-3-O-rhamnósido)

	Rutina
	Miricetina
	Miricetina (Miricetina-3-*O*-rhamnosido)

Anexo II. Ensayos para la medida de la actividad antioxidante en cerveza.

Ensayo	Método	Fundamento del método	Técnica empleada
ORAC	HAT	Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por AAPH.	Fluorescencia
LPIC	HAT	Reacción antioxidante para inhibir la peroxidación de lípidos inducida por un sistema Fenton.	Colorimetría
TRAP	HAT	Eliminación de los radicales derivados del luminol, generados a partir de la descomposición de la AAPH.	Quimioluminiscencia
SASA	HAT	Reacción para eliminar la formación de radicales superóxido.	Colorimetría
ABTS	HAT	Antioxidante para eliminar un radical catiónico orgánico.	Colorimetría
HORAC	HAT	Disminución de radicales OH generados por un sistema de tipo Fenton basado en Co(II).	Pérdida de fluorescencia
CUPRAC	SET	Reducción de Cu (II) a Cu (I).	Colorimetría
FRAP	SET	Reacción con un complejo de Fe (III).	Colorimetría
DPPH	SET	Reacción antioxidante con un radical orgánico.	Colorimetría
PFRAP	SET	Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior con Fe^{3+}.	Colorimetría
MCA		Quelación de iones con ferrozina.	Colorimetría
ECL		Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido radiación de diferente longitud de onda.	Espectros de excitación/emisión de fluorescencia
ESR		Resonancia de espín electrónico.	Espectros de excitación/emisión de fluorescencia

AAPH, 2,2'-azinobis (2-amidinopropane) dihydrichloride; **ORAC,**Oxygen radical-absorbing capacity assay; **LPIC,** Lipid peroxidation inhibition capacity assay; **TRAP,** Total radical trapping antioxidant parameter; **SASA,** Superoxide anion radical scavenging activity; **ABTS,** 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation scavenging activity assay; **HORAC,** Hydrosyl radical averting capacity assay; **CUPRAC, c**upric ion reducing antioxidant capacity assay; **FRAP,** Ferric-reducing antioxidant power assay; **DPPH,** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity assay; **PFRA,** Potassium ferricyanide reducting power method; **MCA,** Metal-chelating activity assay; **ECL,** Enhanced chemiluminescence; **ESR,** electron spin resonance. **HAT**, Hydrogen atom transfer **SET**, Single electron transfer.