

Informe de trabajo final de carrera



Cerveza artesanal estilo sour con agregado de frutos patagónicos: efecto sobre la calidad organoléptica y fisicoquímica

Modalidad: Trabajo de investigación

Alumno: Ulises Fontana

N° de legajo: 27995/0

Correo electrónico: fontanaulises@gmail.com

Director: Dra Maria Laura Lemoine

Co-Director: Ing Agr. Federico Martín Pintos

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales (LIPA) y Curso de Agroindustrias. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.

2020



*INFORME DE TRABAJO FINAL DE CARRERA PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE INGENIERO AGRÓNOMO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y
FORESTALES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y afectos, por acompañarme a lo largo de toda la carrera.

A la cátedra de Agroindustria y el LIPA, especialmente a Ariel Vicente, María Laura Lemoine, Federico M. Pintos y Luis M. Rodoni.

A la familia Laurus y especialmente a Ignacio Curto y Marco Fontana.

A Eugenia.

RESUMEN

En este trabajo final de carrera, se realizó el diseño de una cerveza artesanal con la incorporación de frutos de calafate (*Berberis microphylla*) liofilizados.

Se diseñó una cerveza estilo "Fruit Beer", para ello se elaboró una cerveza ácida o sour estilo "Berliner Weisse" como cerveza base a la cual posteriormente se le añadió la fruta.

Primeramente se realizó un ensayo para determinar la cantidad de fruta a adicionar a la cerveza, para ello se elaboraron cervezas con 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado incorporándolo luego de la fermentación, posteriormente, con la cantidad de fruta a agregar ya seleccionada, se realizó un ensayo de almacenamiento a 5 °C. Los análisis se realizaron al comienzo del almacenamiento y se repitieron a los 30, 60 y 90 días.

La adición de la fruta provocó un cambio del color hacia tonos rojos, con un incremento en el °Hue y la absorbancia a 520 nm. La acidez, la densidad y el pH no se modificaron por el agregado de fruta, rondando este último valores de 3.4. El nivel de antocianinas varió entre 29-100 mg D3GE L⁻¹. La menor concentración de fruta duplicó la capacidad antioxidante de la cerveza base tanto por ABTS^{•+} como por Folin-Ciocalteu, que se incrementó con el agregado de mayores cantidades de calafate. La cerveza con 5 g L⁻¹ fue seleccionada por jueces entrenados. Tanto la cerveza base y con agregado de calafate fueron bien aceptadas por un público no entrenado. Durante 90 días de almacenamiento a 5 °C, las características fisicoquímicas, el color, la capacidad antioxidante y las características organolépticas de la cerveza con 5 g L⁻¹ de calafate se mantuvieron estables.

Los resultados indicaron que el calafate es una buena opción para elaborar cerveza ácida con fruta con buena aceptabilidad sensorial y características fisicoquímicas, rica en antioxidantes que a la vez son estables durante el almacenamiento a 5 °C hasta 90 días.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	09
1.1 Cerveza artesanal.....	09
1.2 Cerveza ácida (Berliner Weisse) con agregado de fruta “Fruit Beer”.....	10
1.3 Antecedentes de Incorporación de fruta a la cerveza.....	11
1.4 Calafate.....	12
1.5 Cosecha de frutos de calafate.....	13
1.6 Manejo poscosecha de frutos de calafate.....	14
1.7 Características nutricionales de los frutos de calafate.....	14
1.7.1 Antocianinas.....	15
1.8 Secado por liofilización.....	17
1.9 Utilización del fruto de calafate en matrices alimentarias.....	17
1.10 Calidad y conservación de la cerveza.....	18
1.11 Agregado de calafate a la cerveza.....	19
1.12 Comentario final.....	20
2. OBJETIVO GENERAL.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIALES y METODOLOGIA.....	22
3.1. Material vegetal.....	22
3.2 Proceso de elaboración de la cerveza utilizada.....	22
3.3 Agregado de frutos de calafate (Berberis microphylla) liofilizados en la cerveza artesanal y selección de la concentración adecuada.....	24
3.4 Almacenamiento de la cerveza artesanal con agregado de frutos de calafate (B. microphylla) liofilizados.....	25
3.5 Métodos analíticos.....	25

3.5.1 Color.....	25
3.5.2 Color EBC y densidad de color.....	26
3.5.3 pH y Acidez.....	26
3.5.4 Densidad y sólidos solubles.....	26
3.5.5 Contenido de Antocianinas.....	26
3.5.6 Capacidad Antioxidante contra el radical ABTS•+.....	27
3.5.7 Fenoles totales.....	27
3.5.8 Análisis sensorial jueces entrenados.....	28
3.5.9 Análisis sensorial con consumidores.....	28
3.6 Análisis estadístico.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1 Selección de la concentración adecuada de frutos de calafate agregado a la cerveza.....	29
4.1.1 Color.....	29
4.1.2 Color EBC, color rojo (Abs. a 520 nm) y densidad de color.....	32
4.1.3 pH, densidad y acidez.....	33
4.1.4 Contenido de antocianinas, sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) y capacidad antioxidante de las cervezas con diferente agregado de calafate...	34
4.1.5 Análisis sensorial jueces entrenados.....	37
4.1.6 Análisis sensorial con consumidores no entrenados.....	39
4.2. Almacenamiento de la cerveza seleccionada.....	40
4.2.1 Acidez, pH, densidad de las cervezas durante el almacenamiento.....	41
4.2.2 Color cerveza durante el almacenamiento.....	41
4.2.3 Color EBC, color rojo (Abs. a 520 nm) y densidad de color durante el almacenamiento.....	43

4.2.4 Contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) y capacidad antioxidante durante el almacenamiento.....	44
4.2.5 Análisis sensorial de las cervezas durante el almacenamiento con jueces entrenados.....	46
5. CONCLUSIONES.....	49
6. BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1: Planta de calafate.....	12
Imagen 2: Detalle de las flores (izquierda) y frutos (derecha).....	13
Imagen 3: Estructura y sustituyentes de las antocianidinas (Durst y Wrolstad, 2001).....	16
Imagen 4: Antocianinas predominantes en diferentes frutas y hortalizas.....	16
Imagen 5: Detalle de calafates luego de la liofilización.....	17
Imagen 6: Productos regionales a base de calafate.....	18
Imagen 7: Diagrama de flujo de la elaboración de la cerveza realizada, resaltando con una línea intermitente los pasos que diferencian la elaboración de una cerveza ácida (fermentación primaria láctica) con los comunes a todos los otros estilos de cervezas.....	23
Imagen 8: Modelo de color CIE L* a*b*.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Foto de las cervezas con diferentes agregados de calafate en vasos de precipitado, de izquierda a derecha 0 g L-1, 2,5 g L-1, 5 g L-1, 10 g L-1 (A).

Parámetros de color CIE lab, L*(B), a*(C), b*(D) y °Hue (E) de las cervezas con agregados de 0 g L-1, 2,5 g L-1, 5 g L-1 y 10 g L-1 de calafate liofilizado.....	31
Figura 2: Color rojo (Abs. a 520 nm) (A), Color EBC (B) y Densidad de color (C), de cerveza con agregados de 0 g L-1, 2,5 g L-1, 5 g L-1 y 10 g L-1 de calafate liofilizado.....	32
Figura 3: Contenido de antocianinas (A), sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu FC (B) y capacidad antioxidante por ABTS•+ (C) de las cervezas con agregados de 0, 2,5; 5 y 10 g L-1 de calafate liofilizado.....	36
Figura 4: Puntajes obtenidos en una escala del 1 al 10 de los descriptores evaluados (aceptabilidad general, apariencia, aroma, flavour, acidez y balance general) por jueces BJCP de las cervezas con agregados de 2,5; 5 y 10 g L-1 de calafate liofilizado.....	38
Figura 5: Puntajes obtenidos para los parámetros evaluados (color, aroma, sabor y aceptabilidad general) por consumidores no entrenados de la cerveza sin y con la concentración de calafate seleccionada de 5 g L-1.....	39
Figura 6: Respuestas del panel de consumidores no entrenados frente a la pregunta si habían consumido este estilo de cervezas (ácidas con agregado de frutas).....	40
Figura 7: Evolución del color CIE Lab en cervezas sin (a la izquierda) y con (a la derecha) agregado de 5 g L-1 de calafate durante el almacenamiento de 90 días a 5 °C. Luminosidad L* (A y B), a* (C y D), b* (E y F) y °Hue (G y H).....	42
Figura 8: Evolución de los parámetros de color durante el almacenamiento de 90 días a 5 °C de cerveza sin (a la izquierda) y con agregado de 5 g L -1 de calafate (a la derecha): Color EBC (A y B), Color rojo con absorbancia a 520 nm (C y D), la densidad del color (E y F).....	44

Figura 9: Contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) (A y B) y capacidad antioxidante por ABTS•+ (C y D) de cervezas sin (a la izquierda) y con agregado de 5 g L-1 de calafate (a la derecha) almacenadas durante 90 días a 5 °C.....	45
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de pH, densidad y acidez de las cervezas con distintas concentraciones de calafate agregada.....	33
Tabla 2: Contenido de antocianinas, sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por ABTS•+, en frutos de calafate fresco y liofilizado.....	34
Tabla 3: Valores obtenidos de acidez, pH y densidad de cerveza sin y con agregado de calafate de 5 g L-1 liofilizado durante el almacenamiento a 5 °C.....	41
Tabla 4: Puntajes otorgados por jueces entrenados para cada parámetro evaluado en el análisis sensorial de la cerveza con agregado de 5 g L-1 de calafate durante 90 días de almacenamiento a 5 °C.....	46
Tabla 5: Puntajes otorgados por jueces entrenados para cada parámetro evaluado en el análisis sensorial de la cerveza sin agregado de calafate durante 90 días de almacenamiento a 5 °C.....	46
Tabla 6: Imágenes de las cervezas sin y con agregado de calafate a los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cerveza artesanal

Una de las bebidas más difundidas en todo el mundo es la cerveza, en Argentina, en los últimos años esta bebida ha ido desplazando al consumo tradicional del vino (Ablin, 2014).

El consumo per cápita de cerveza en Argentina en el año 2018 fue de 45 litros, siendo inferior a otros países latinoamericanos. De estos 45 litros un 2,5 % corresponde a cerveza artesanal. Este valor varía regionalmente, siendo mayor en polos cerveceros como Mar del Plata donde alcanza el 12 % del mercado de cerveza. Aun así, se encuentra muy por debajo del valor norteamericano, el cual se sitúa entre 15-17 % del total de cerveza consumida.

Se estima que, en el año 2018, existían en Argentina cerca de 800 fábricas de cerveza, donde trabajaban más de 6000 empleados según la Cámara Argentina de Cerveza Artesanal (CCAA). Sólo en la provincia de Buenos Aires, el crecimiento anual de nuevas fábricas durante 2017 fue del 25 % (15 % en el resto del país). Esos establecimientos bonaerenses tienen una capacidad de producción de 50.000 litros por mes. En la ciudad de La Plata, en los últimos años, el municipio y los cerveceros artesanales han comenzado a trabajar en conjunto para poder regular la elaboración y comercialización de cerveza artesanal, reconociendo más de 300 emprendedores que emplean a más de 5000 personas en fábricas que, en su mayoría, no presentan habilitación. Según Cerveceros Argentinos, la cámara que nuclea al negocio tradicional en el país, la venta de artesanales crece a un ritmo de 40 % por año, aunque apenas representan el 2 % del mercado total.

En Argentina el crecimiento de las cervezas artesanales, empezó a generar consumidores cada vez más especializados que comenzaron a demandar nuevos estilos y con la mayor calidad. Este proceso fue acompañado de la incorporación de nuevas técnicas, mundialmente distribuidas y de nuevos insumos, muchas veces importados.

Existe un abanico muy grande de estilos de cervezas, es por eso que la organización estadounidense BJCP (Beer Judge Certification Program) fue fundada para fomentar el conocimiento, comprensión y apreciación de estos diversos estilos existentes en el mundo, además de estandarizar el sistema de evaluación de los mismos y ayudar en la formación de jueces internacionales.

1.2 Cerveza ácida (Berliner Weisse) con agregado de fruta “Fruit Beer”

Las cervezas ácidas o sour beers son estilos que se elaboran de forma artesanal, su producción se ha incrementado en los últimos años, según la guía BJCP de estilos, las cervezas estilo European Sour Ale como las belgas Lambic y Flander y la alemana Berliner Weisse son ejemplos clásicos de este estilo de cerveza.

En este trabajo se utilizó como cerveza base el tradicional estilo alemán Berliner Weisse (cerveza sour típica de la región de Berlín) transformándose en el estilo “Fruit Beer” una vez que se le añadió la fruta. En este estilo se busca principalmente generar una armoniosa combinación entre la cerveza base y la fruta que se agrega, repercutiendo en sus características organolépticas (apariencia, aroma, flavour, sabor, entre otras).

La cerveza base o Berliner Weisse, consiste en una cerveza de 50 % trigo, clara, ácida y refrescante en base a frutas, la cual es obtenida mediante una fermentación láctica previa a la alcohólica con lactobacilos. Contiene bajo contenido alcohólico y alto nivel de carbonatación.

Las etapas de la elaboración de cerveza serán descritas en el apartado de materiales y métodos (sección 3.2), destacando los pasos que caracterizan a la elaboración de este tipo de cervezas. La adición de las frutas puede hacerse en diversas etapas del proceso; en la etapa de cocción, durante o posterior a la fermentación, en la etapa de maduración o en el envase final, ya sea en barril o botella.

En el presente trabajo el término “cerveza ácida” hará referencia a una cerveza acidificada por medio de lactobacilos específicos. Cabe esta aclaración debido a que no deben ser confundidas con otro tipo de cervezas ácidas como pueden ser aquellas con fermentaciones espontáneas o alternativas, inoculadas con levaduras “salvajes” o acidificadas completamente mediante la adición de frutas o añejadas en barricas.

1.3 Antecedentes de Incorporación de fruta a la cerveza

La incorporación de fruta en la cerveza data desde la civilización egipcia quienes se conoce que elaboraban una especie de cerveza a la cual ocasionalmente agregaban dátiles y granadas. Más contemporáneos a ellos, y con una concepción de cerveza más cercana a la actual, podemos tomar el primer registro de una cerveza con agregados de fruta el que Randy Mosher menciona en la investigación para su libro “Radical Brewing” y data del 1614 en Alemania, siendo Heinrich Knaus quien añadió cerezas (con carozo incluido) a la elaboración de su cerveza. También relata el hallazgo de un recetario de cervezas francés, del año 1828, en el cual incita al lector a utilizar diversas frutas, como frambuesas, grosellas, fresas, pelones, duraznos y cerezas. Bien conocidas son las recetas de cervezas alemanas del siglo diecisiete y dieciocho que fomentan la utilización de frambuesas, cerezas y una variedad de duraznos llamada “sloe”. También aparece la “ebulum”, en antiguos recetarios ingleses como en la literatura antigua, la cual es una cerveza con agregado de bayas de saúco. Por supuesto que no se pueden omitir las tradicionales cervezas belgas *Kriek* (con agregados de cerezas) ni *Frambuoise* (con agregado de frambuesas), las cuales son alternativas de las famosas cervezas lámbicas de fermentación espontánea, con unos registros que datan desde los años 30.

1.4 Calafate

La producción de “berries” comprende diversas especies como las frutillas, frambuesas, arándanos, grosellas, entre otras frutas, sus cultivos se distribuyen a lo largo del país dependiendo de sus condiciones edafo-climáticas. En la Argentina la producción de berries se ubica en quinto lugar después de la de cítricos, uva, frutos de pepita y carozo, constituyendo uno de los sectores de mayor dinamismo y crecimiento en las últimas dos décadas. Dentro del grupo de los berries se destacan también las especies nativas de la Patagonia como las del género *Berberis*, entre los cuales se encuentra el “calafate” (*Berberis microphylla*).

El Calafate (*Berberis microphylla*) es un arbusto espinoso perenne de la familia de las *Berberidaceae*, que puede llegar a medir hasta 3 metros de altura. Esta especie crece espontáneamente en diversas condiciones ambientales desde el clima árido y semiárido frío típico de la zona extra andina, hasta en los climas subpolares oceánicos característico de la Patagonia andina (Arena et al., 2018).

Estos arbustos se convierten en forraje para los rumiantes, quienes consumen sus flores, frutos y brotes tiernos. También cumplen con un rol fundamental en el ecosistema como refugio de varias especies animales y previniendo procesos erosivos en los suelos tan comunes en la región (Bottini et al., 1993).



Imagen 1: Planta de calafate.

Cuenta con flores solitarias o agrupadas en inflorescencias de dos o tres flores. Posee seis pétalos y seis sépalos de color amarillo (Imagen 2). Sus frutos son bayas subglobosas de 0,7 a 1,1 cm de diámetro (Imagen 2), con 6 a 10 semillas negras oscuras a marrones virando del color verde en su estado inmaduro al azul oscuro, violáceo cuando llega a su punto de madurez, presentan un promedio de 9,9 semillas por fruto (Arena y Curvetto, 2008).



Imagen 2: Detalle de las flores (izquierda) y frutos (derecha).

La fruta comercializada proviene de plantas en estado silvestre, que crecen y se diseminan de manera natural y se encuentra distribuida a lo largo de la Patagonia tanto chilena como argentina, desde Neuquén (37° LS) hasta Tierra del Fuego (54°8' LS) y desde los Andes hasta la meseta y costa oriental patagónica (Bottini, 2000).

1.5 Cosecha de frutos de calafate

El criterio de cosecha de los frutos se basa normalmente en el color superficial de las bayas, la calidad de los frutos se evalúa a través del aspecto externo (color, tamaño, forma, ausencia de defectos), la firmeza y su sabor. Debido a que los frutos no siguen madurando una vez cosechados, la misma debe realizarse al momento de la plena madurez. En la literatura se ha informado que al momento de cosecha el contenido de sólidos solubles es de 20 ° Brix, aproximadamente, estos niveles son muy variables por estar supeditados a las condiciones climáticas (Arena y Curvetto, 2008; Moghaddan et al., 2013). Los frutos

maduros presentan una elevada acidez comparada con otras especies frutales, el ácido málico es el ácido orgánico predominante conteniendo de 3 a 3,4 % de este ácido (Arena et al., 2013) y un valor de pH de 3 a 3,4 (Arena y Curvetto, 2008).

1.6 Manejo poscosecha de frutos de calafate

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

En tal sentido, el procesamiento de estos frutos aparece como una estrategia de interés para reducir estas mermas, agregar valor y aumentar la oferta tanto geográfica como estacional. Es así que la utilización de técnicas conocidas de conservación, como la liofilización adquieren relevancia.

1.7 Características nutricionales de los frutos de calafate

El calafate se destaca principalmente por su capacidad antioxidante y por su elevado contenido de hidratos de carbono y ácidos orgánicos que le otorgan un alto valor nutricional. La capacidad antioxidante del calafate es unas diez veces mayor que la de frutas como manzana, naranja y pera y cuatro veces mayor que la del arándano cuyos frutos son reconocidos por su elevada capacidad anti radical (Rodoni et al., 2014). Las antocianinas

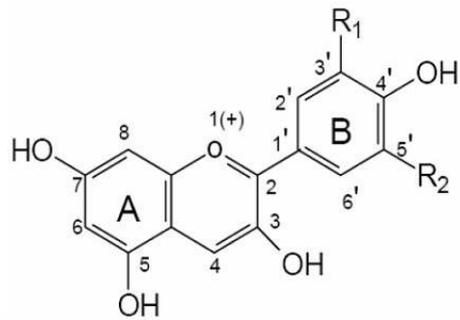
delfinidina, cianidina y petunidina constituyen los principales compuestos antioxidantes (Ruiz et al., 2010) conteniendo 761 mg/100 g de antocianinas en frutos frescos (Arena y Curvetto, 2008). El contenido de ácido ascórbico en estos frutos es moderado ($\sim 250 \text{ mg kg}^{-1}$) (Akbulut et al., 2009).

El consumo de berries se ha asociado con la prevención de ciertas enfermedades crónicas y degenerativas, lo que ha aumentado su popularidad en forma vertiginosa (WHO/FAO, 2004). Como se mencionó anteriormente los frutos de *B. microphylla*, son altamente ricos en compuestos antioxidantes por lo que son muy apreciados por estas características (Arena et al., 2012; Rodoni et al., 2014).

En las últimas décadas, ha surgido el interés de incorporar a diferentes matrices alimentarias, aditivos de sustancias naturales provenientes de diversas fuentes vegetales. En general, se busca reemplazar los aditivos sintéticos utilizados para estabilizar los alimentos por sustancias naturales que son mucho más aceptadas por los consumidores (O'Connell y Fox, 2001). En este sentido además de sacar provecho de los antioxidantes presentes en el fruto de calafate de manera funcional al contenido nutritivo, la presencia de antocianinas en el mismo lo hacen un excelente colorante natural.

1.7.1 Antocianinas

Las antocianidinas son una sub-clase de compuestos dentro de los flavonoides. Las antocianinas son glucósidos hidrosolubles formados por una estructura fenólica (antocianidina) y uno o más azúcares asociados que dan a los frutos en muchos casos su color azul, violáceo y/o rojo (Imagen 3). Se conocen 5 antocianidinas que pueden ser agrupadas por el color mayoritario: pelargonidina (naranja), cianidina y peonidina (naranja-rojo) delfinidina, petunidina y malvidina (color azul-rojo).



Aglicona	Substitución		λ_{max} (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Imagen 3: Estructura y sustituyentes de las antocianidinas (Durst y Wrolstad, 2001).

La estabilidad de estos compuestos depende de su estructura química, del pH y de la composición de la matriz donde se encuentran. Son relativamente estables a pH menores a 3 (máxima estabilidad a pH 1) mientras que a pH de 4,5 o mayores comienzan a sufrir reacciones de hidratación transformándose en chalconas incoloras. Las más estables son las antocianinas acetiladas (Wrolstad, 2004) en contraposición a las no acetiladas. Los berries son ricos en las antocianinas no acetiladas.

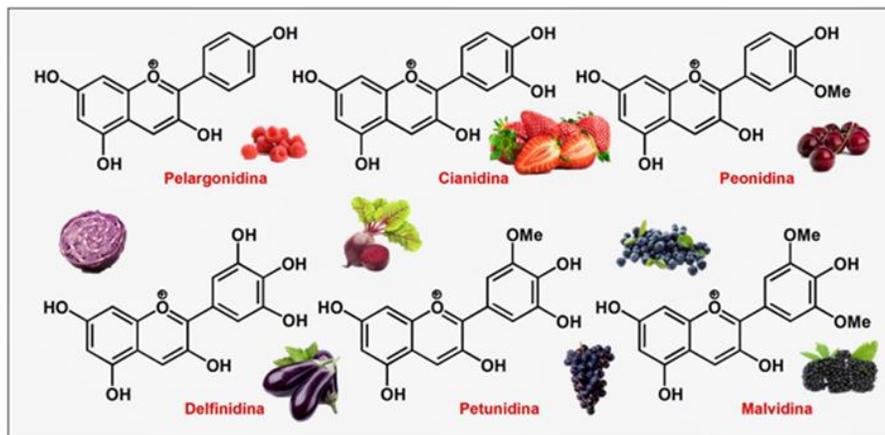


Imagen 4: Antocianinas predominantes en diferentes frutas y hortalizas.

1.8 Secado por liofilización

La liofilización consiste en el desecado por medio de la sublimación del agua contenida en los frutos. Es decir, congelar el producto y posteriormente remover el hielo por sublimación, aplicando temperatura en condiciones de vacío, por lo que no se alcanzan temperaturas que puedan modificar o deteriorar la composición química y nutricional de los mismos, conservando las sustancias volátiles y/o termo sensibles. De esta forma se obtienen productos de alta calidad que conservan todas sus propiedades nutricionales y organolépticas y permite su conservación sin cadena de frío, ya que su bajo porcentaje de humedad posibilita obtener una elevada estabilidad microbiológica, y además mejora la eficiencia del traslado, almacenamiento y manipulación, debido a no necesitar refrigeración y a la disminución del peso y volumen de los mismos (Parzanese, 2013).



Imagen 5: Detalle de calafates luego de la liofilización.

1.9 Utilización del fruto de calafate en matrices alimentarias

El INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) en Chile, comenzó con un programa de domesticación del calafate, reconociendo más de 300 ecotipos y diferenciándolos según su fruto, priorizando los más aptos para ser incorporados en productos elaborados comerciales.

Es así que estos frutos han sido incorporados al Código Alimentario Argentino por Resolución Conjunta 22/2006 y 409/2006, autorizándose su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados, confites y bebidas sin alcohol. Actualmente es habitual encontrarlos especialmente en la región patagónica donde es consumido por pobladores locales y turistas (Arena y Curvetto, 2008).



Imagen 6: Productos regionales a base de calafate.

La utilización de los frutos de calafate en bebidas no es un fenómeno reciente, los pueblos Tehuelches preparaban una bebida a base de una maceración en agua de los frutos triturados, sin dejarlos fermentar (Alonso y Desmarchelier, 2006). Los pueblos Mapuches, por su lado, elaboraban una especie de “chicha” a partir de la fermentación del fruto y su posterior mezcla con el “chacai” como también un “vino de calafate” con la fermentación solo de los frutos (Alonso y Desmarchelier, 2006).

1.10 Calidad y conservación de la cerveza

Durante el almacenamiento de la cerveza un factor de pérdida de calidad es la generación de *off-flavors* debido a reacciones de oxidación de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga (Li et al., 2016). La ocurrencia o no de estas reacciones va a depender

fundamentalmente del balance redox y el contenido de antioxidantes del producto final (Jaskula-Goiris et al., 2014), sumado a las condiciones de almacenaje, siendo la luz, los movimientos y el oxígeno los factores principales que aumentan la oxidación con la consecuente pérdida de calidad del producto.

El deterioro en la cerveza puede detectarse de manera química como sensorial, siendo este último el método más utilizado por los cerveceros artesanales.

En términos sensoriales, lo primero que pierde una cerveza, es el carácter fresco del lúpulo y la malta, seguido del amargor y comienza a sentirse más dulce en aroma y en boca, donde aparecen los descriptores característicos de “acartonado” o “papel”.

Otro factor importante a tener en cuenta durante el almacenamiento de la cerveza es su poder antioxidante dado principalmente por compuestos polifenólicos provenientes en un 80% de la malta y en 20% del lúpulo (Jurková et al., 2012). El contenido de polifenoles en la cerveza también está influenciado por los factores genéticos de sus materias primas, por las condiciones ambientales en las que crecen y por los factores tecnológicos de elaboración (Rivero, 2005). Algunos estudios observaron que la incorporación de extractos obtenidos del lúpulo con alto contenido en polifenoles lograron incrementar la capacidad antioxidante y la estabilidad durante el almacenamiento (Goiris et al., 2014, Jaskula-Goiris et al., 2014). Sin embargo, la incorporación a la cerveza de otras matrices ricas en antioxidantes y su influencia en la conservación durante el almacenamiento no ha sido estudiada.

1.11 Agregado de calafate a la cerveza

Una forma de agregarle valor al fruto y aprovechar su producción estacional es secarlo por medio de la liofilización, de esta manera se conservan todas sus propiedades nutricionales organolépticas. Esta técnica permite el consumo en la zona de producción y también el

trasladado a regiones más lejanas donde de otra forma no estaría disponible sin perder calidad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la factibilidad de diseñar una cerveza ácida artesanal con la incorporación de frutos de calafate liofilizados y determinar de qué manera este agregado impacta en las características fisicoquímicas, sensoriales y antioxidantes inmediatamente terminado el producto y en el almacenamiento.

1.12 Comentario final

Cabe destacar que los estudios epidemiológicos sugieren que el consumo regular y moderado de bebidas fermentadas (vino y cerveza) confiere una mayor protección cardiovascular que las bebidas espirituosas. Parte de los efectos protectores de la cerveza y el vino se debe a su contenido alcohólico y parte a sus componentes no alcohólicos (principalmente polifenoles). La relación dosis-efecto entre el consumo de cerveza o vino y la mortalidad se caracteriza por una llamada "curva en forma de J", con un menor riesgo para los consumidores de alcohol de leve a moderado que para los abstemios o los grandes bebedores. Por lo tanto las promesas nutricionales que surgieran del presente estudio contemplaran estos criterios de salud científicamente respaldados (De Gaetano et al., 2016).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la factibilidad de obtener cerveza artesanal con agregado de valor, a partir de la incorporación a la misma de frutos de calafate (*Berberis microphylla*).

Hipótesis:

-La incorporación de frutos de calafate en la cerveza artesanal permite generar un producto con buenas características fisicoquímicas, aceptabilidad sensorial y contenido de antioxidantes inmediatamente terminado el producto y durante el almacenamiento.

2.1 Objetivos específicos:

1-Evaluar el impacto del agregado de diferentes concentraciones de calafate sobre la calidad sensorial, fisicoquímica y antioxidante de cerveza artesanal.

Hipótesis 1

-El agregado de frutos de calafates permite obtener una cerveza con elevadas cualidades sensoriales y antioxidantes dependiendo de la cantidad de fruto adicionado sin alterar las características fisicoquímicas.

2-Evaluar la calidad fisicoquímica y sensorial y contenido de antioxidantes durante el almacenamiento de la cerveza artesanal con agregado de frutos de calafate liofilizados.

Hipótesis 2

-El agregado de frutos de calafate permite mantener una buena calidad sensorial, fisicoquímica y elevado contenido de antioxidantes de la cerveza artesanal durante el almacenamiento.

3. MATERIALES y METODOLOGIA

3.1 Material vegetal Se utilizaron frutos de calafate (*Berberis microphylla*) recolectados maduros en su población silvestre local a principios de 2018, situada en las cercanías de la ciudad de Ushuaia, 54° 48 S, 68° 19W (Tierra del Fuego, Argentina). Los frutos se lavaron con agua corriente y luego con una solución de NaClO 100 mg L⁻¹, se congelaron en N₂ líquido y se liofilizaron en un liofilizador (RIFICOR, Argentina). El proceso de secado se efectuó a 35°C a 1.6 mm Hg o 2,13 mbar por 48 horas, posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

3.2 Proceso de elaboración de la cerveza utilizada

La cerveza fue elaborada en la fábrica de cerveza artesanal LAURUS S.R.L, ubicada en la localidad de La Plata, contando con habilitación municipal correspondiente, en agosto de 2019. Se elaboró una cerveza sour estilo Berliner Weisse, la misma es una cerveza ácida que posee una fermentación láctica controlada con microorganismos lácticos específicos, previa a la fermentación alcohólica básica. Para ello se realizaron las siguientes etapas de elaboración:

Molienda: Se molieron 10 kg de grano de una mezcla de 50 % malta base Pilsen (Sacha Maltería Platense) y 50 % trigo malteado (Maltear).

Maceración: Se usó agua de red, filtrada por un equipo de osmosis inversa, con el objetivo de quitar la carga de sales. Se comenzó el proceso de macerado con 55 L a los cuales se le adicionó 3 g de CaCl₂, 1 g de CaSO₄, 0,7 g de CaCO₃, 0,7 g de MgSO₄ y 15 g de ácido fosfórico para corregir el pH de la maceración. El macerado se realizó a 67 °C durante 90 minutos, ajustando el pH a 5,5 y obteniendo una densidad final de 1,048 g/cm³. Posteriormente se lavó el grano con 25 L de agua de osmosis a una temperatura de 78 °C,

con el objetivo de inactivar enzimas y disminuir la viscosidad resultando en un mayor rendimiento.

Cocción: El mosto se hirvió durante 15 minutos a 101°C con el fin de eliminar la flora microbiana. Luego se enfrió a 35 °C.

Fermentación primaria láctica: Se utilizó un cultivo de *Lactobacillus plantarum* Sour Pitch (Wild Brew- Lallemand) para la acidificación láctica, el mismo se agregó al mosto a 35 °C. El pH inicial fue de 5,4 y se dejó incubar 24 horas a 35 °C, hasta alcanzar un pH de 3,4.

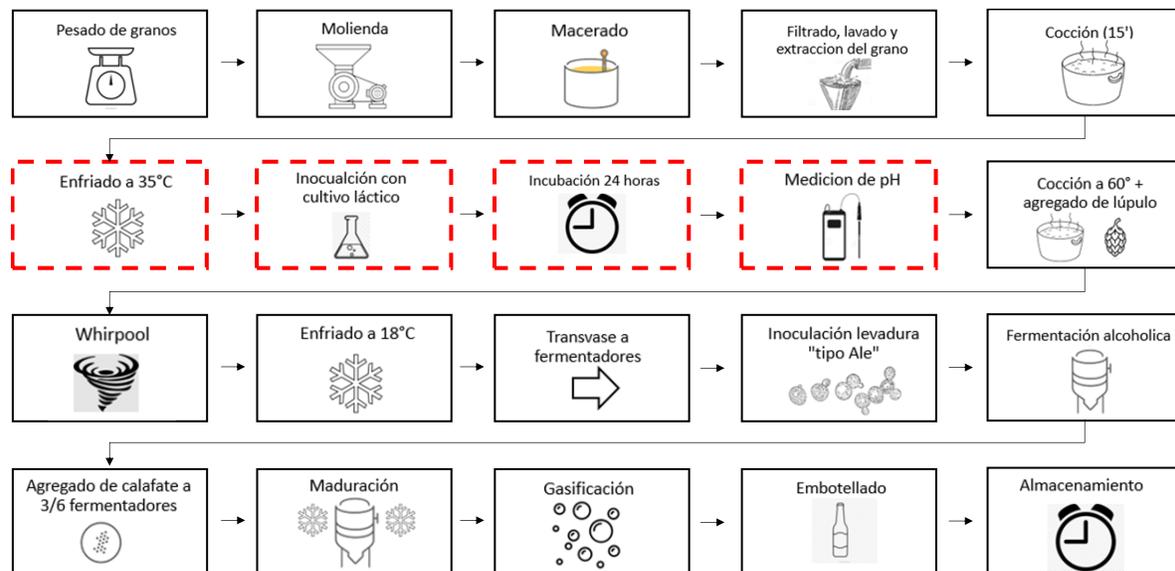


Imagen 7: Diagrama de flujo de la elaboración de la cerveza realizada, resaltando con una línea intermitente los pasos que diferencian la elaboración de una cerveza ácida (fermentación primaria láctica) con los comunes a todos los otros estilos de cervezas.

Cocción y whirlpool: Luego de la fermentación láctica se hirvió el mosto durante 60 minutos, añadiendo 30 g de pellets de lúpulo variedad Crystal (Estados Unidos), nutrientes para levaduras (Servomyces) y un clarificante (Irish moss). Se obtuvo una densidad final de 1,037 g/cm³. Después de la cocción se realizó el whirlpool, con el fin de que las partículas y los sólidos del mosto se acumulen en el centro de la cuba, favoreciendo así la obtención de un mosto mucho más limpio.

Fermentación alcohólica: El mosto se enfrió a 18 °C y se inoculó con levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ale Nottingham) a razón de 0,8 g L⁻¹ de mosto para la fermentación alcohólica. El volumen final se dividió en 6 fermentadores (obteniendo 8 litros en cada fermentador). Los fermentadores utilizados fueron de plástico, con una válvula de salida inferior. La fermentación alcohólica fue realizada en las cámaras de la cátedra de Agroindustria de la FCAYF a una temperatura de 17 °C durante 9 días.

3.3 Agregado de frutos de calafate (*Berberis microphylla*) liofilizados en la cerveza artesanal y selección de la concentración adecuada

Se adicionó a la cerveza artesanal diferentes cantidades de frutos para evaluar las siguientes formulaciones:

A-Control sin agregados

C-Con el agregado de 2,5 g L⁻¹ de calafates liofilizados

D-Con el agregado de 5 g L⁻¹ de calafates liofilizados

E-Con el agregado de 10 g L⁻¹ de calafates liofilizados

El agregado de los frutos liofilizados se efectuó al final de la fermentación. Se burbujeó con CO₂ por 10 minutos para asegurar el mezclado del fruto. La cerveza con y sin el agregado de frutos se almacenó a 10 °C por 5 días. Luego se clarificó descendiendo la temperatura a 5 °C por 2 días y se embotellaron bajo presión (debido a que la cerveza fue gasificada con CO₂) en envases de 340 mL color caramelo. En una primera instancia para seleccionar la cerveza con la formulación más aceptable se efectuaron los análisis sensoriales y analíticos de las tres cervezas con fruta, y posteriormente, con la cerveza con la concentración de calafate seleccionada, se realizó otra elaboración y se procedió al almacenamiento de la misma. Para realizar las determinaciones analíticas de pH, densidad, acidez y análisis sensorial se utilizaron muestras de cerveza luego de dos días del envasado conservadas a 5 °C. Para las determinaciones de antocianinas, fenoles y antioxidantes,

alícuotas de cerveza se congelaron a -18 °C. Luego se descongelaron, se centrifugaron a 5000 rpm x 5 min y se agitaron en vortex por 10 minutos a velocidad máxima para eliminar los restos de CO₂. Los análisis se detallan en la sección 3.5.

3.4 Almacenamiento de la cerveza artesanal con agregado de frutos de calafate (*B. microphylla*) liofilizados

En la segunda elaboración, la cerveza se dividió en 6 fermentadores, a 3 fermentadores se les agregó la fruta en la concentración seleccionada, y a los 3 fermentadores restantes no se les agregó fruta. Las cervezas con la concentración seleccionada y las cervezas sin agregado de frutas, se embotellaron bajo presión en envases de 340 mL color caramelo. Las cervezas se almacenaron a 5 °C por 90 días. Se tomaron muestras al inicio del envasado y cada 30 días. Las muestras de cerveza se procesaron como se indicó en 3.3 y se evaluó el efecto del agregado de los frutos sobre el pH, acidez, sólidos solubles, densidad, color, capacidad antioxidante, antocianinas, fenoles totales y características sensoriales durante el almacenamiento. Las determinaciones se efectuaron según se menciona en la sección 3.5.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Color: El color superficial se evaluó midiendo los parámetros CIE Lab, L*, a* y b* con un colorímetro (Minolta CR-400, Osaka, Japón) equipado con un cabezal sumergible. Se colocaron 10 mL de muestra desgasificada en una cubeta cilíndrica de 2 cm de diámetro y 2 cm de altura donde se sumergió el cabezal del colorímetro para la determinación. El ángulo hue (°H) fue calculado como $^{\circ}H = \tan^{-1} (b/a) \times (180^{\circ}/3,14)$ cuando a y b > 0 o $^{\circ}H = 360^{\circ} + (\tan^{-1} (b/a) \times 180^{\circ}/3,14)$ cuando a > 0 y b < 0.

3.5.2 Color EBC y densidad de color: El parámetro EBC (European Brewery Convention) es la escala europea de medición del color de las cervezas. El color EBC se determinó espectrofotométricamente con un espectrofotómetro (Numak 721, Visible) midiendo la absorbancia a 430 nm y 520 nm en una cubeta de 10 mm de longitud y multiplicando dicho valor por 25. La absorción de luz eventualmente causada por la turbidez se extrajo midiendo adicionalmente a 700 nm.

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

Referencia:

- EBC < 15 cervezas claras.
- EBC > 15 cervezas oscuras.

La densidad de color se calculó como

$$\text{Densidad de color} = (\text{Abs}_{430} - \text{Abs}_{700}) + (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})$$

3.5.3 pH y Acidez: Se tomó una alícuota de 10 mL de cerveza, se agregó 100 mL de agua destilada y se midió el pH con un peachimetro (NUMAK). Con la misma solución se realizó una titulación ácido base con NaOH 0,1N hasta pH 8,2 (AOAC, 1980). Las medidas se realizaron por duplicado y la acidez se expresó en miliequivalentes de protones por litro de cerveza (meq H⁺ L⁻¹).

3.5.4 Densidad y sólidos solubles: Se determinó con densímetro y refractómetro digital (Milwaukee, MA871), respectivamente. La densidad se expresó en miligramos por litro (g L⁻¹) y los sólidos solubles en grados Brix (°Brix).

3.5.5 Contenido de Antocianinas: El contenido de antocianinas se determinó espectrofotométricamente por el método diferencial de pH (Giusti y Wrolstad, 2005). Las muestras de cerveza procesadas como se detalló en 3.3 fueron centrifugadas, se diluyeron

con buffer KCl (0,025 M, pH: 1) o con buffer acetato de sodio (0,4 M, pH: 4,5). Se midió la absorbancia de ambas soluciones a 520 nm. El contenido de antocianinas se expresó como mg de delfinidina-3-glucósido (D3G) por L⁻¹ utilizando el coeficiente de extinción para D3G de $\epsilon = 0,051 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$:

$$\text{D3G (mg L}^{-1}\text{)} = [(\text{Abs.}_{520; \text{pH: 1}} - \text{Abs.}_{700; \text{pH: 1}}) \times \text{FD} - (\text{Abs.}_{520; \text{pH: 4,5}} - \text{Abs.}_{700; \text{pH: 4,5}}) \times \text{FD.}] \times \epsilon^{-1} \times 1 \text{ cm}^{-1}$$

FD: Factor de dilución.

3.5.6 Capacidad Antioxidante contra el radical ABTS^{•+}: El ensayo de ABTS^{•+} se realizó según lo descrito por Arnao, (2001). La solución madre de ABTS^{•+} se preparó pesando 7 mmol de sal ABTS^{•+} de amonio y 2,45 mmol de K₂S₂O₈, que se añadieron a agua destilada hasta completar 1 L de solución y se dejaron reaccionar durante la noche a 20 °C en la oscuridad. La solución de trabajo ABTS^{•+} se preparó diluyendo la solución madre hasta una absorbancia de 0.700 ± 0.03 a 734 nm. Luego, se añadieron 20 µL de cerveza a 1 mL de solución de trabajo ABTS^{•+}, se agitó, se incubó durante 6 min y se midió la absorbancia a 734 nm. Las muestras se midieron por triplicado. Se utilizó Trolox ® como estándar antioxidante y los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox® (TEAC) sobre una base de peso en fresco (mg L⁻¹).

3.5.7 Fenoles totales: Se añadieron 50 µL de cerveza a 950 µL de agua destilada y 50 µL de reactivo Folin Ciocalteu (FC) diluido en agua 1:1. Después de 3 min, se añadieron 100 µL de una solución de 20% (m/v) de Na₂CO₃ en 0,1 mol L⁻¹ NaOH y la solución resultante se incubó a 25 ° C durante 90 min (Singleton, Orthofer, y Lamuela -Raventos, 1999). Se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 760 nm, las sustancias reactivas al Folin Ciocalteu (FC) se cuantificaron usando ácido gálico (GA) como estándar. Los resultados se

expresaron como ácido gálico equivalentes AGE (mg L^{-1}). Las muestras se analizaron por duplicado por tiempo de almacenamiento.

3.5.8 Análisis sensorial jueces entrenados: Para la selección de la cerveza con diferentes concentraciones de fruta agregada y de la cerveza seleccionada durante el almacenamiento, se realizó una evaluación sensorial con dos expertos reconocidos por “Beer Judge Certification Program”. Se analizaron los descriptores: apariencia, aroma, flavour, acidez, balance e impresión general.

3.5.9 Análisis sensorial consumidores: La calidad sensorial de la cerveza seleccionada se analizó mediante un ensayo de aceptabilidad con 60 consumidores no entrenados, se utilizaron los descriptores: color, aroma, sabor y aceptabilidad general. Los datos obtenidos se procesaron con un ANOVA para cada descriptor por separado.

3.6 Análisis estadístico

Para la selección del nivel de agregado de fruta y para el ensayo de almacenamiento se utilizó un diseño factorial. En el primer ensayo el factor fue el nivel de calafate adicionado. En el segundo ensayo los factores fueron el nivel de fruta y el tiempo de almacenamiento. Se calculó la desviación estándar y los datos se analizaron por medio de un ANOVA con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2011). Las medias se compararon mediante un test de Tuckey $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de la concentración adecuada de frutos de calafate agregado a la cerveza

4.1.1. Color

El color de la cerveza es uno de los parámetros que más impactan a la hora de caracterizar este estilo de cervezas con agregados de frutas. Los frutos de calafate poseen un alto contenido de antocianinas, lo que es muy importante ya que le imparte un color característico a la cerveza.

Para poder evaluar de manera objetiva y reproducible el color, existen escalas que dan una representación gráfica y numérica del mismo, es decir definen una serie de parámetros que lo describen. El sistema CIE L^* , a^* , b^* es un sistema de coordenadas (Imagen 8) con tres planos o ejes: L^* que representa la luminosidad y oscila desde 0 (negro) a 100 (blanco), a^* que comprende colores verdes (valores negativos de a^*) a rojos (valores positivos de a^*) y b^* que va desde los tonos azules (valores negativos de b^*) a amarillos (valores positivos de b^*). En el centro se percibe acromatismo (colores grises). Los valores de L^* y $^{\circ}\text{Hue}$ ($\arctan b^*/a^*$) simbolizan la luminosidad y tonalidad respectivamente. Estos parámetros se obtienen con un colorímetro (ver sección 3.5.4).

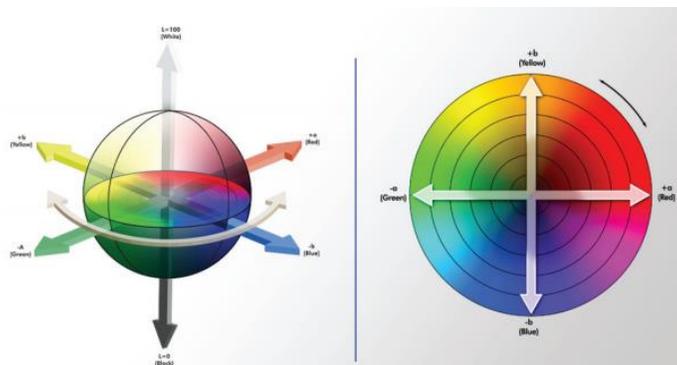


Imagen 8: Modelo de color CIE L^* a^*b^* .

En este trabajo se obtuvieron valores de luminosidad (L^*) cercanos a 19 para la cerveza base y valores de L^* de 14; 12,5 y 11,5 para las cervezas con 2,5; 5 y 10 g L^{-1} de calafate agregado respectivamente (Figura 1B), lo que indicó que a medida que se aumentó la concentración de fruta incorporada, los valores de luminosidad L^* disminuyeron, las cervezas se fueron tornando más oscuras. En la Figura 1C y 1D se observa un valor cercano a 1 del parámetro a^* y valores cercanos a 5 de b^* para la cerveza sin agregado de calafate, es decir con mayor componente amarillo, mientras que las cervezas con agregado de calafate presentaron valores significativamente mayores de a^* cercanos a 9 y valores de b^* cada vez más negativos, es decir con más componente rojo, a medida que se aumentó la concentración de calafate agregado, en concordancia con Hornicar et al., 2020 que también observaron un aumento en el componente del color rojo en la cervezas con agregado de extractos de berenjena.

En la Figura 1E se observa el tono de las cervezas representado por el $^{\circ}\text{Hue}$, se puede apreciar la diferencia entre la cerveza sin fruta y con fruta. La cerveza sin fruta tiene una tonalidad amarilla que se ubica en el primer cuadrante con un valor de $^{\circ}\text{Hue}$ de aproximadamente 67, mientras que las cervezas con calafate muestran ángulos $^{\circ}\text{Hue}$ con valores cercanos a los 320-350 que las ubica en el cuarto cuadrante representando a los tonos rojos, que se corresponden con los valores de a^* y b^* obtenidos para los diferentes agregados.

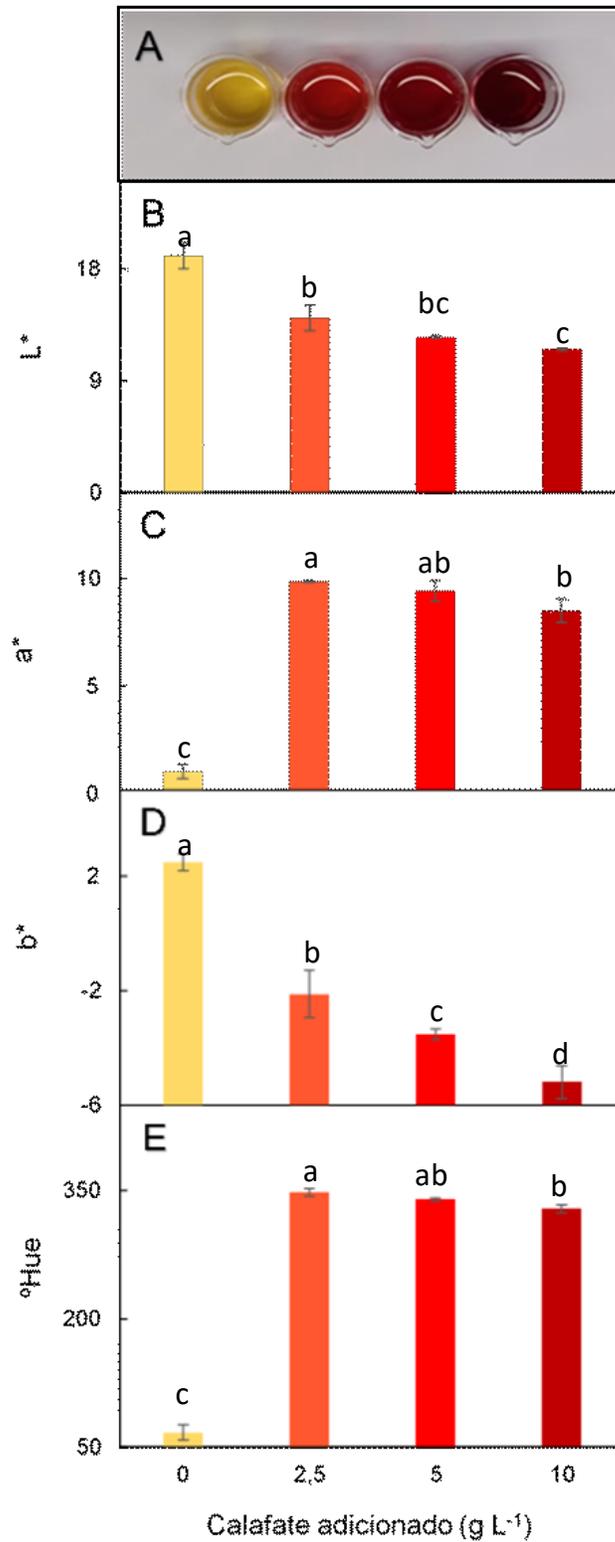


Figura1: Foto de las cervezas con diferentes agregados de calafate en vasos de precipitado, de izquierda a derecha 0 g L⁻¹, 2,5 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ (A). Parámetros de color CIE lab, L*(B), a*(C), b*(D) y °Hue (E) de las cervezas con agregados de 0 g L⁻¹, 2,5 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

4.1.2. Color EBC, color rojo y densidad de color

El color EBC (European Brewery Convention), es la escala de medición del color de las cervezas, mide la absorbancia de la misma a 430 nm por espectrofotometría y el valor se multiplica por 25.

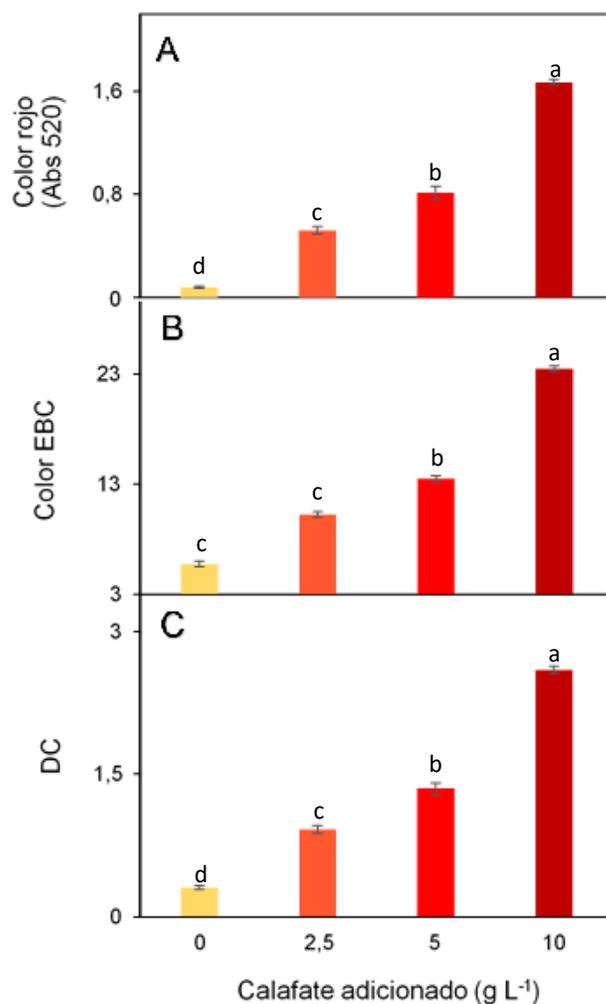


Figura 2: Color rojo (Abs. a 520 nm) (A), Color EBC (B) y Densidad de color (C), de cerveza con agregados de 0 g L⁻¹, 2,5 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

En la Figura 2 puede observarse que a medida que aumentó el nivel de agregado de fruta, aumentó la absorbancia a 520 nm, por lo tanto, el color rojo, que su vez se relacionó con un aumento de color EBC, llegando a valores similares a cervezas rojas u oscuras para el

mayor nivel de agregado. La densidad de color también siguió la tendencia antes mencionada. Estos últimos dos parámetros nos dan un dato concreto sobre la estabilidad de las antocianinas en la matriz cervecera.

4.1.3. Valores de pH, densidad y acidez

En las cervezas artesanales tradicionales el valor de pH ronda normalmente los 4,5; en el caso de las cervezas tipo Berliner weisse debido a la fermentación láctica, el pH es menor, de aproximadamente 3,5 (Tabla1); por eso son llamadas cervezas tipo ácidas.

Tabla 1: Valores de pH, densidad y acidez de las cervezas con distintas concentraciones de calafate agregada. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

Calafate agregado (g L ⁻¹)	pH	Densidad (mg L ⁻¹)	ACIDEZ (mEq H ⁺ L ⁻¹)
0	3,44 ±0,01a	1010 ± 0,7b	63±6b
2,5	3,44 ±0,02a	1011 ±0,3ab	67±1b
5	3,45 ±0,01a	1011 ±0ab	68±6b
10	3,41 ±0,01a	1012 ±0a	79±1a

En este trabajo se pudo observar que el agregado de fruta, no afectó el pH de la cerveza, si bien el calafate es una fruta ácida con valores cercanos a pH 3,5 la incorporación a la cerveza de estos frutos no modificó los valores de pH de la misma.

También pudo observarse que la cantidad de calafate agregada no influyó en el pH, observándose valores similares de pH en las cuatro concentraciones de agregado de calafate.

La densidad y la acidez medida en mEq H⁺ L⁻¹ mostraron una tendencia a aumentar con la mayor incorporación de fruta.

4.1.4. Contenido de antocianinas, sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) y capacidad antioxidante de las cervezas con diferente agregado de calafate

En el calafate, como se mencionó anteriormente (sección 1), las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, son polifenoles los cuales poseen un doble potencial, su capacidad colorante y antioxidante. La antocianina más abundante en el calafate es la delphinidina 3-glucosido (Pino et al., 2018). En la Tabla 2 podemos observar el contenido de antocianinas, las sustancias reactivas al FC y la capacidad antioxidante por ABTS^{•+}, en frutos de calafate fresco y liofilizado.

Tabla 2: Contenido de antocianinas, sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por ABTS^{•+}, en frutos de calafate fresco y liofilizado.

	CALAFATE	
	Fresco	Liofilizado
Antocianinas (mg D3G g⁻¹)	10,9 ±0,7	29,4 ±0,1
Sust. reactivas al FC (mg AGE g⁻¹)	14,6 ±1,7	40,2 ±7
ABTS^{•+} (mg TE g⁻¹)	12,7 ±2,3	30,1 ±4

Valores en peso fresco.

Con el proceso de liofilización de los frutos de calafate, el contenido de antocianinas no fue afectado, manteniendo inalterada además su capacidad antioxidante (Tabla 2). El contenido de antocianinas en la cerveza sin fruta, como era de esperarse, no fue detectado, ya que la materia prima que se usa para la elaboración de la cerveza sin fruta no posee este tipo de compuestos. En cuanto a la cerveza con el agregado de frutos de calafate, se pudo observar que a medida que se incrementó la concentración de fruta añadida también aumentó el contenido de antocianinas en la misma (Figura 3). De la concentración total de antocianinas del fruto de calafate liofilizado sólo quedó disponible en la cerveza entre el 30 y 40 % de las

antocianinas. Cuando se incrementó la concentración de calafate agregado de 2,5 a 5 g L⁻¹ la cantidad de antocianinas en la cerveza aumentó un 37 % y cuando se aumentó de 5 a 10 g L⁻¹ se incrementó un 54 %.

Las sustancias con actividad antioxidante presentes en la cerveza provienen esencialmente de las materias primas empleadas en su elaboración, estando ya presentes en aquellas u obteniéndose por modificación y transformación de sus constituyentes (González-San José, 2010). Entre estas sustancias destacan los polifenoles, que provienen esencialmente, como se mencionó anteriormente, en un 70-80 % de la cebada malteada y un 20 % del lúpulo. Estos compuestos juegan un rol fundamental en la capacidad antioxidante y en la estabilidad sensorial de la cerveza (Gerhäuser 2009).

El contenido de fenoles totales se evaluó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. La adición de frutos de calafate liofilizados a la cerveza aumentó considerablemente el contenido de compuestos fenólicos, partiendo de valores de 160 mg L⁻¹ de AGE en la cerveza base, incrementando el contenido de estos compuestos en la cerveza con agregado de calafate con contenidos de fenoles de 275, 300 y hasta 360 mg L⁻¹ de AGE representando un aumento del 42 %, 46 % y un 55 % para las concentraciones de 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate adicionado respectivamente (Figura 3). Otros autores reportaron valores superiores de polifenoles en las cervezas artesanales en un rango de polifenoles totales que va de 700 a 1330 mg AGE L⁻¹ (Pachas, 2019).

El contenido de fenoles totales encontrados en este tipo de cerveza fue menor al reportado por bibliografía para las cervezas ale de 100 % malta, para este estilo de cerveza se usó 50% de trigo malteado, lo que podría haber afectado el contenido de fenoles ya que estos pueden formar complejos con las proteínas del trigo y no encontrarse disponibles como tales (Delvaux et al., 2003).

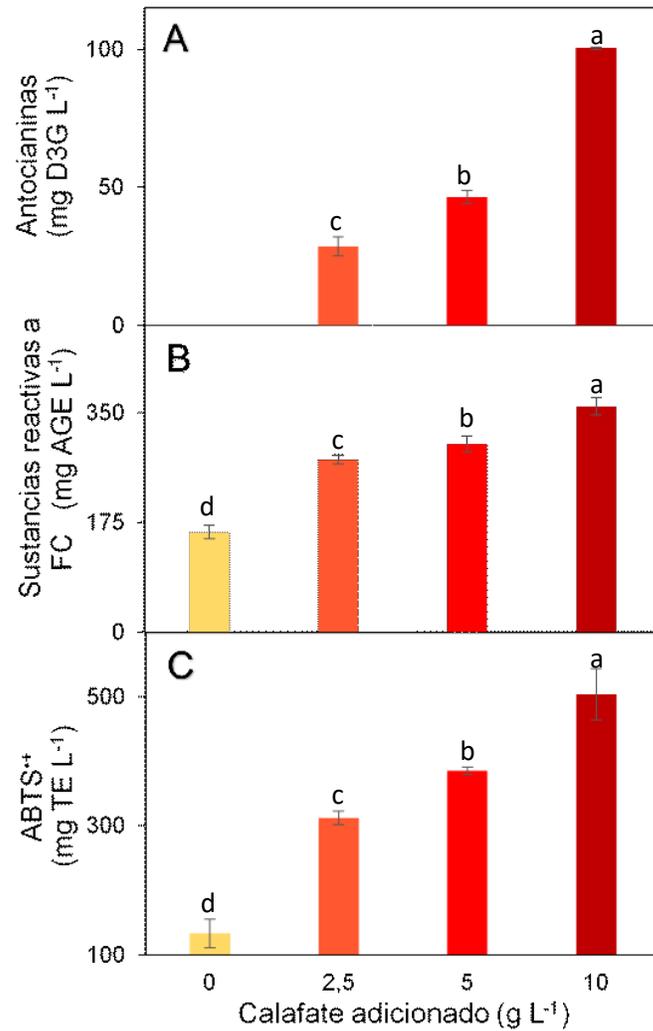


Figura 3: Contenido de antocianinas(A), sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu FC (B) y capacidad antioxidante por ABTS⁺⁺ (C) de las cervezas con agregados de 0, 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

La capacidad antioxidante total de las muestras de cerveza se evaluó mediante un ensayo ABTS^{•+} con el cual se determinó TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity o capacidad antioxidante de equivalentes al Trolox). Los resultados de la capacidad antioxidante de las cervezas se presentan en la Figura 3. Los valores de TEAC para la cerveza sin fruta fueron de 133 mg TE L⁻¹. La adición de calafate liofilizado resultó en un aumento significativo en la capacidad antioxidante de la cerveza en aproximadamente un 57 %, 65 % y 73 % para las concentraciones de 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate adicionado respectivamente. Como ya se mencionó, la capacidad antioxidante en la cerveza está dada principalmente por el contenido de compuestos polifenólicos propios de los componentes de la cerveza y además en el caso de las cervezas con el agregado de fruta se suma la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del fruto de calafate. Resultados similares fueron descritos por Hornicar et al., (2020) en la cuantificación de la actividad antioxidante de cervezas con agregados de cantidades crecientes de extractos antociánicos a la cerveza.

4.1.5. Análisis sensorial jueces entrenados

El análisis sensorial es el examen de los atributos del producto mediante los sentidos (vista, olfato, gusto y tacto), obteniendo datos cuantificables y objetivos. Es una herramienta útil para medir atributos en cerveza artesanal. La incorporación de calafate a la cerveza no sólo puede influir en la calidad general y en sus propiedades nutricionales, sino que también puede afectar las propiedades sensoriales.

La evaluación sensorial para la selección de la cantidad adecuada de fruta agregada a la cerveza se realizó con un panel de jueces entrenados del Beer Judge Certification Program (BJCP) que es un programa internacional que certifica y califica a los jueces de cerveza, tomando como base los estándares de estilo preestablecidos en la Guía de Estilos de Cerveza.

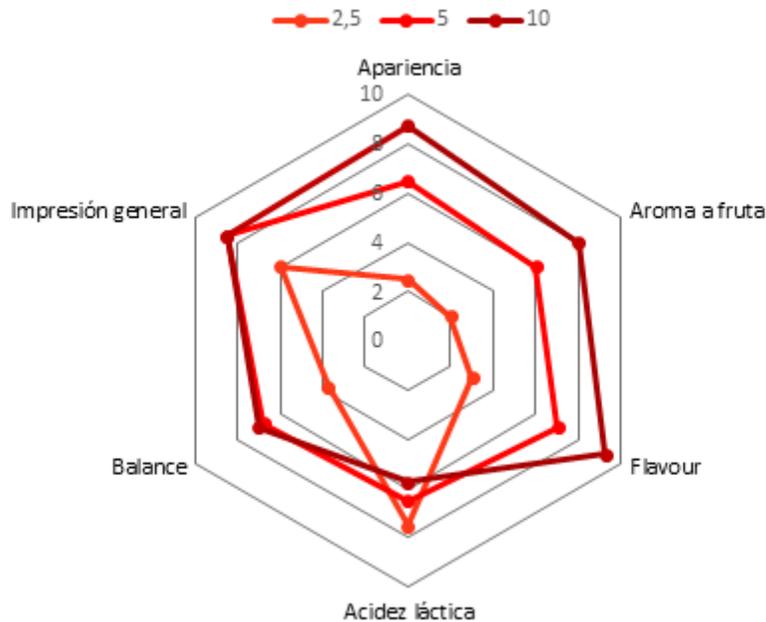


Figura 4: Puntajes obtenidos en una escala del 1 al 10 de los descriptores evaluados (apariencia, aroma, flavour, acidez, balance e impresión general) por jueces BJCP de las cervezas con agregados de 2,5; 5 y 10 g L⁻¹ de calafate liofilizado.

Con los datos obtenidos en las evaluaciones, se representaron gráficamente los promedios por atributo en cada producto, es decir, se creó un perfil descriptivo con un diagrama de telaraña para cada una de las características evaluadas (apariencia, aroma, flavour, acidez, balance y aceptabilidad general), donde cada una de los puntos presentes en el diagrama corresponde a un atributo, la intensidad de este se incrementa a medida que se aleja del punto central (Figura 4).

Las cervezas con el agregado de 5 y 10 g L⁻¹ de calafates liofilizados respecto a aquella con agregado de fruta de 2,5 g L⁻¹ presentaron los puntajes más altos para casi todos los descriptores evaluados excepto acidez, donde este puntaje fue similar para las tres concentraciones de fruta agregada. El hecho de que no haya grandes diferencias en la aceptación organoléptica entre las dos incorporaciones de mayor concentración de fruta inclinó la elección hacia aquella con la de menor cantidad de fruta y contemplando la repercusión económica que conlleva duplicar la cantidad de fruta por litro de cerveza,

resultó la elección de una concentración de fruta de 5 g L⁻¹, por lo tanto la cerveza con agregado de 5 g L⁻¹ de calafate liofilizado fue la seleccionada para continuar con el ensayo de almacenamiento.

4.1.6. Análisis sensorial con consumidores no entrenados

Para evaluar el nivel de aceptación de la cerveza con la concentración de calafate seleccionada (5 g L⁻¹) por los jueces entrenados, se realizó un test de aceptabilidad general con consumidores no entrenados. Para ello se analizaron los parámetros de aceptabilidad general, aroma, gusto, balance y color cuyos puntajes medios obtenidos pueden observarse en la Figura 5. Tanto la cerveza base, como la cerveza con calafate tuvieron buena aceptación por parte del consumidor, la cerveza con fruta obtuvo mayor puntaje en los parámetros de color, sabor y aceptabilidad general y el color fue el parámetro que más influyó en la aceptabilidad.

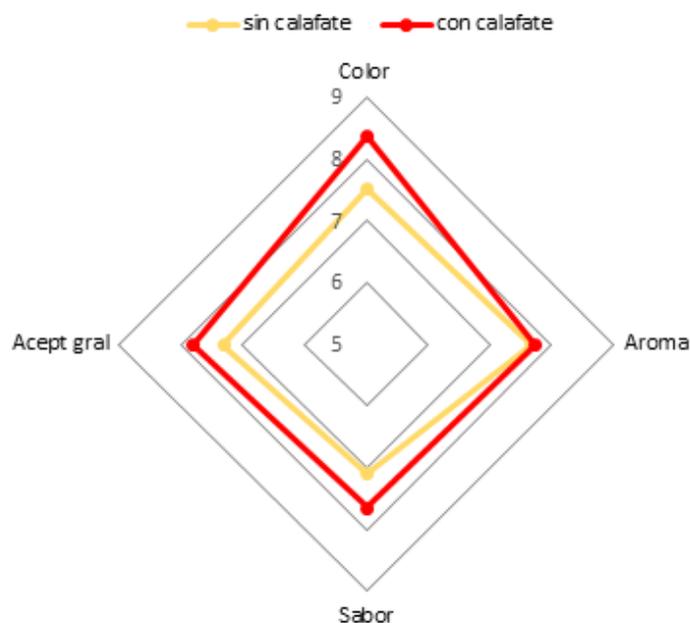


Figura 5: Puntajes medios obtenidos para los parámetros evaluados (color, aroma, sabor y aceptabilidad general) por consumidores no entrenados de la cerveza sin y con la concentración de calafate seleccionada de 5 g L⁻¹.

Por otro lado, se les consultó a los consumidores si habían tomado alguna vez cerveza de este estilo. En la Figura 6 puede observarse que la mayoría de los consumidores no habían probado anteriormente este estilo de cerveza.

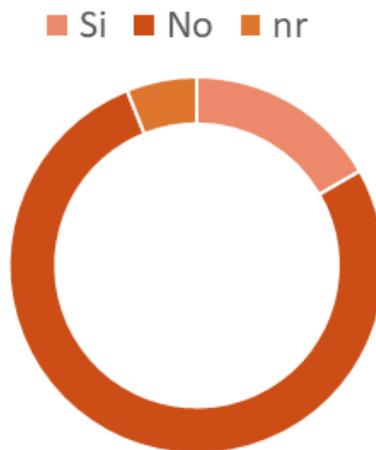


Figura 6: Respuestas del panel de consumidores no entrenados frente a la pregunta si habían consumido este estilo de cervezas (ácidas con agregado de frutas).

Teniendo en cuenta los resultados de forma global y especialmente los obtenidos en el análisis sensorial, la cerveza con 5 g L⁻¹ de calafate agregado tuvo una buena aceptación por parte de los consumidores, el agregado de calafate no influyó negativamente en la aceptación de la cerveza con agregado de fruta respecto de la cerveza base.

4.2. Almacenamiento de la cerveza seleccionada

Una vez seleccionada la cerveza con la cantidad de calafate agregado de 5 g L⁻¹ se procedió al almacenamiento a 5 °C de la misma junto con la cerveza base, en botellas de vidrio color caramelo.

4.2.1. Acidez, pH, densidad de las cervezas durante el almacenamiento

En la Tabla 3 puede apreciarse una acidez similar entre las cervezas con agregado de fruta y sin fruta, valor que se ve levemente incrementado con el tiempo de almacenamiento. El pH no varió durante el almacenamiento en las dos cervezas analizadas, lo mismo ocurrió con la densidad medida con el refractómetro y con densímetro.

Tabla 3: Valores de acidez, pH y densidad de cerveza sin y con agregado de calafate de 5 g L⁻¹ liofilizado durante el almacenamiento a 5 °C. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

PARÁMETRO	AGREGADO DE CALAFATE (g L ⁻¹)	ALMACENAMIENTO A 5 °C (d)			
		0	30	60	90
ACIDEZ (mEq H ⁺ L ⁻¹)	5	72±2a	78±4a	71±4a	70±4a
	0	70±1a	78±8a	73±1a	74±2a
pH	5	3,45±0,03a	3,32±0,07a	3,43±0,15a	3,45±0,05a
	0	3,44±0,02a	3,32±0,07b	3,51±0,02a	3,42±0,04ab
DENSIDAD (mg L ⁻¹)	5	1011±0,2a	1010±0a	1010±1a	1011±1a
	0	1010±1a	1009±0,3a	1009±0,6a	1011±0,6a

4.2.2. Color cerveza durante el almacenamiento

En la cerveza sin agregado de calafate los valores de L*, a*, b* y por lo tanto de °Hue se mantuvieron estables con valores cercanos a 20, 1, 4 y 80 respectivamente durante los 90 días de almacenamiento refrigerado (Figura 7).

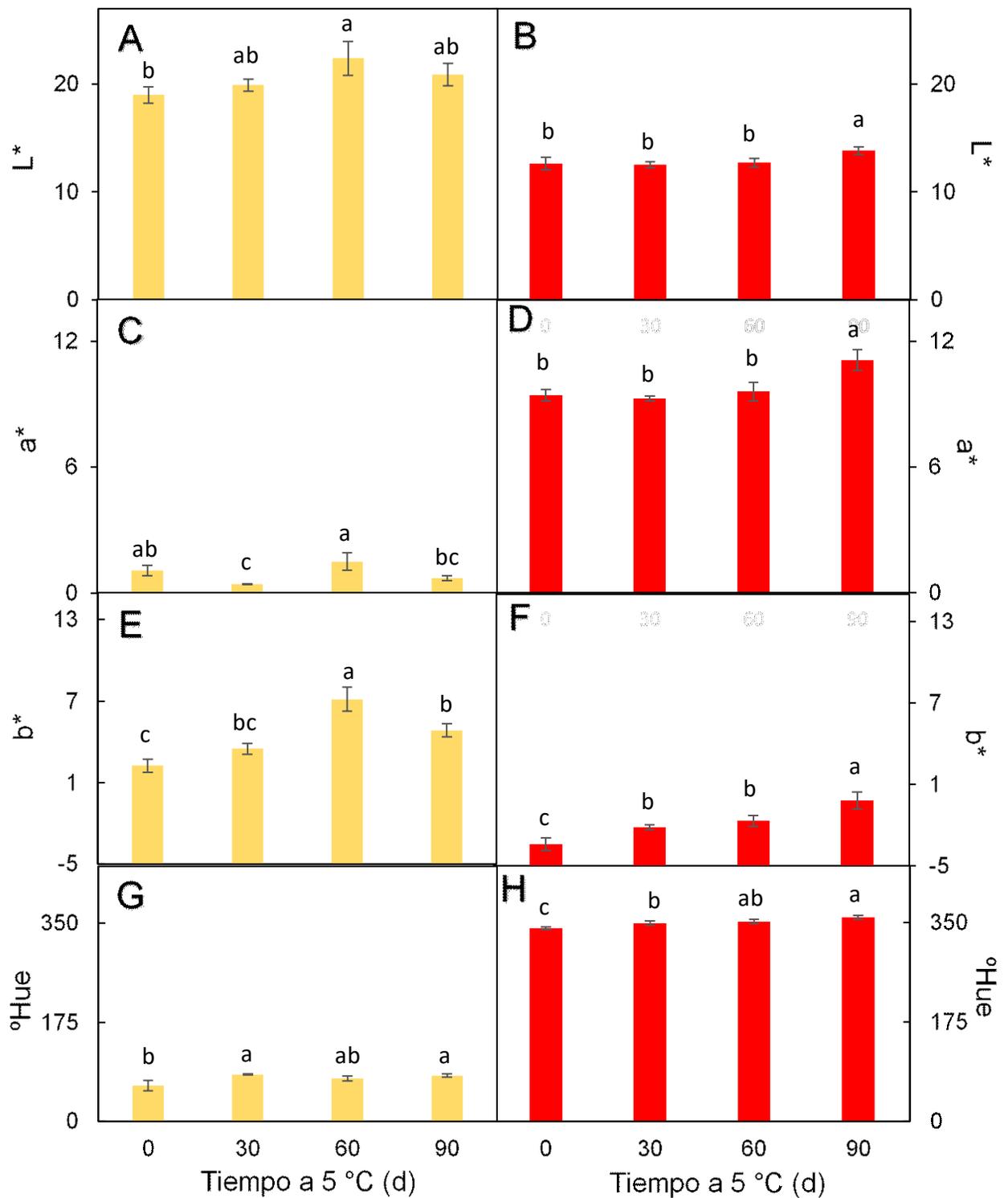


Figura 7: Evolución del color CIE Lab en cervezas sin (a la izquierda) y con (a la derecha) agregado de 5 g L⁻¹ de calafate durante el almacenamiento de 90 días a 5 °C. Luminosidad L* (A y B), a* (C y D), b* (E y F) y °Hue (G y H). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

En las cervezas con agregado de 5 g L⁻¹ de calafate, si bien el color se mantuvo bastante estable a lo largo del almacenamiento, pudo observarse una tendencia leve hacia mayores valores de a* y menores de b*, que se observó también con un leve aumento del °Hue lo que indicaría una tendencia a tonos más rojizos con el avance del almacenamiento. Un parámetro que puede influir sobre el color, es el pH y se pudo observar anteriormente que este no varió durante el almacenamiento, por lo tanto, este comportamiento podría deberse a una ligera degradación de las antocianinas.

4.2.3. Color EBC, color rojo (Abs. a 520 nm) y densidad de color durante el almacenamiento

El color EBC fue 6 y 11 para las cervezas sin calafate y con calafate, respectivamente. Se registró un incremento hacia el final del almacenamiento, período en el que la cerveza sin calafate llegó a 6,8 y la cerveza con calafate a 13,2 (Figura 8). El cambio en el color EBC encontrado aquí fue limitado. Esto coincide con Vanderhaegen et al., (2007), quienes observaron que el cambio de color durante el almacenamiento es menor en cervezas claras de bajo grado alcohólico en comparación a las oscuras o con elevado contenido de alcohol. No se registraron cambios relevantes ni en la absorbancia a 520 nm, ni en la densidad de color de la cerveza sin fruta durante el almacenamiento (Figura 8). La cerveza con calafate comenzó el almacenamiento con un color rojo de 0,720. Se evidenció una reducción del 15 % a los 30 días. Luego de este período el color rojo se mantuvo en niveles constantes. La adición de calafate logró generar una cerveza con un color característico que fue estable durante el almacenamiento. Estos resultados distan de los encontrados por otros autores en donde la adición de vegetales con alto contenido de antocianinas afectó la estabilidad del color durante el almacenamiento (Martínez et al., 2017; Horincar et al., 2020).

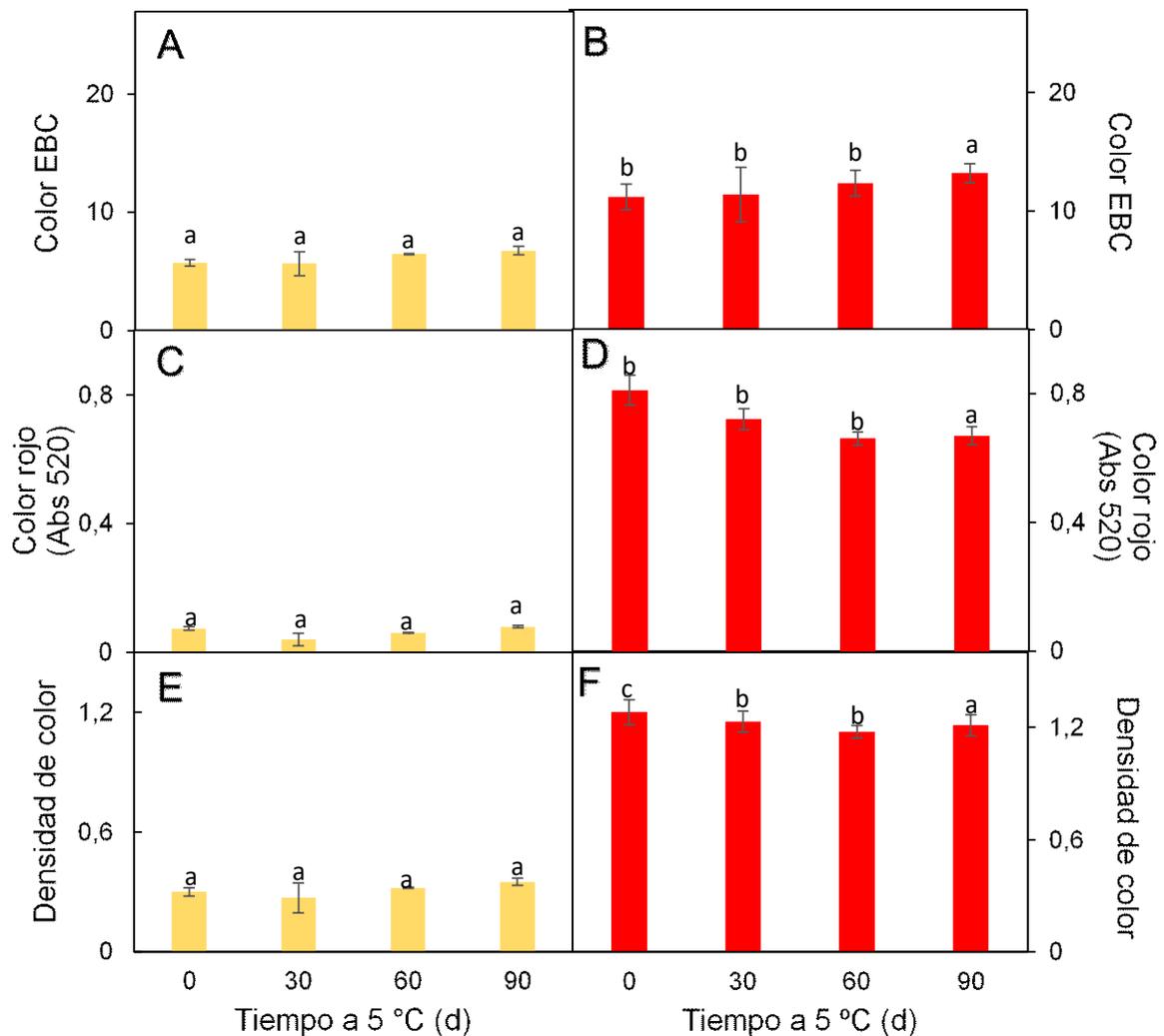


Figura 8: Evolución de los parámetros de color durante el almacenamiento de 90 días a 5 °C de cerveza sin (a la izquierda) y con agregado de 5 g L⁻¹ de calafate (a la derecha): Color EBC (A y B), Color rojo con abs a 520 (C y D), la densidad del color (E y F). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

4.2.4. Contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) y capacidad antioxidante durante el almacenamiento

La cerveza sin fruta comenzó el almacenamiento con 130 mg TE L⁻¹ de actividad antioxidante por ABTS^{•+}. La capacidad antioxidante se incrementó 45 % luego de 30 días, para luego permanecer constante hasta los 90 días (Figura 9). Contrariamente, Martínez et al., (2017) reportaron un descenso o una no variabilidad de la capacidad antioxidante

durante el almacenamiento acelerado de cervezas. La capacidad antioxidante de la cerveza con calafate duplicó la de la cerveza base sin sufrir cambios durante el almacenamiento. Horincar et al., 2020, por el contrario, observaron que la capacidad antioxidante de cerveza enriquecida con antioxidantes de berenjena se redujo durante 21 días de almacenamiento a 5 °C. Las sustancias reactivas al Folin- Ciocalteu siguieron la misma tendencia que por ABTS^{•+}, aunque se observó una menor diferencia entre ambas cervezas (Figura 9).

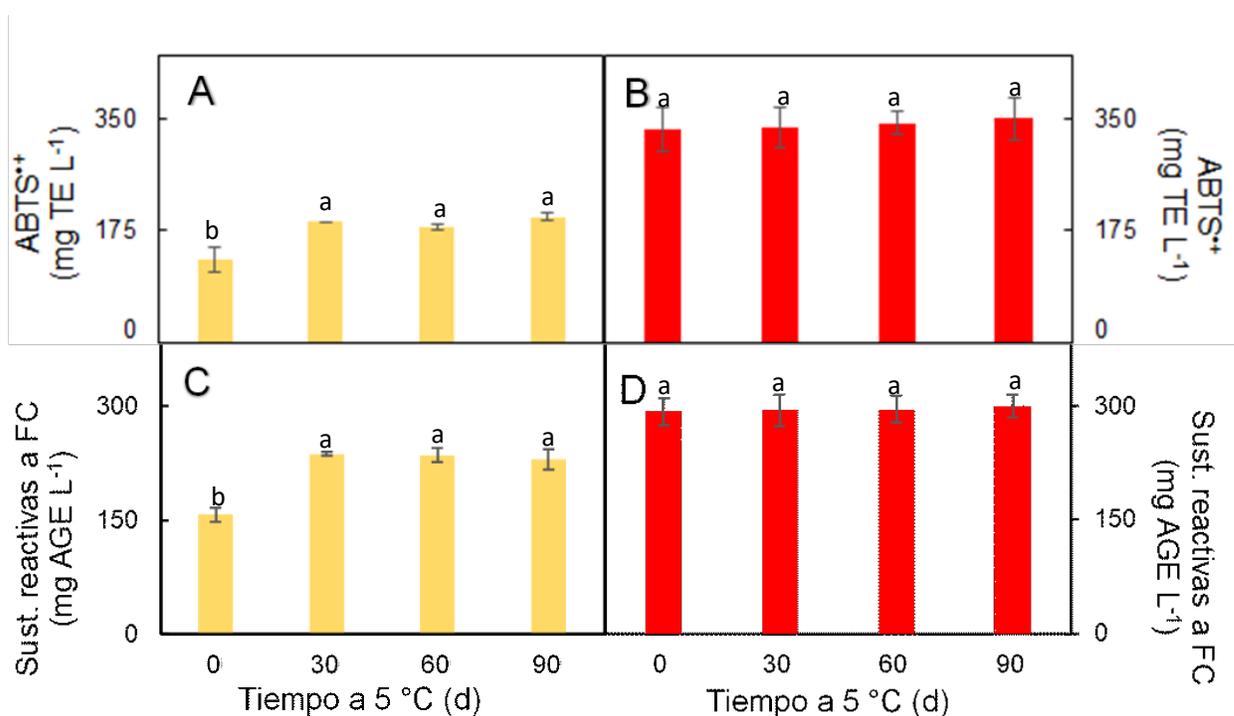


Figura 9: Contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (FC) (A y B) y capacidad antioxidante por ABTS^{•+}(C y D) de cervezas sin (a la izquierda) y con agregado de 5 g L⁻¹ de calafate (a la derecha) almacenadas durante 90 días a 5 °C. Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Tuckey con un nivel de significancia de P < 0,05.

4.2.5. Análisis sensorial de las cervezas durante el almacenamiento con jueces entrenados

Los jueces entrenados evaluaron los descriptores: apariencia, aroma, flavour, acidez, balance y aceptabilidad general de las cervezas en base a un puntaje del 1 al 10 donde los puntajes más bajos representaron una menor aceptación de la cerveza respecto a cada atributo evaluado, mientras que puntajes más altos significaron una característica destacable en la misma.

La evaluación sensorial de las cervezas se realizó al comienzo del almacenamiento y a los 30, 60 y 90 días de almacenamiento a 5 °C.

En las Tablas 4 y 5 puede observarse los puntajes obtenidos para cada descriptor durante el almacenamiento para las cervezas con y sin agregado de calafate respectivamente.

Tabla 4: Puntajes otorgados por jueces entrenados para cada parámetro evaluado en el análisis sensorial de la cerveza con agregado de 5g L⁻¹ de calafate durante 90 días de almacenamiento a 5 °C.

DESCRIPTORES CERVEZA CON AGREGADO DE CALAFATE						
Tiempo (d)	Apariencia	Aroma	Flavour	Acidez	Balance	Aceptabilidad general
0	9 ±1,4	9 ±0	8,25 ±1,1	8,5 ±0,7	8,5 ±0,7	8,5 ±0,7
30	8 ±0	7,5 ±0,7	8,5 ±0,7	9 ±0	8 ±0	9 ±0
60	8,5 ±0,7	7,5 ±0,7	8 ±1,4	8 ±0	7,5 ±0,7	8,5 ±0,7
90	7,5 ±0,7	8 ±0	7 ±1,4	7,5 ±0,7	7 ±1,4	7 ±1,4

Tabla 5: Puntajes otorgados por jueces entrenados para cada parámetro evaluado en el análisis sensorial de la cerveza sin agregado de calafate durante 90 días de almacenamiento a 5 °C.

DESCRIPTORES CERVEZA SIN AGREGADO DE CALAFATE						
Tiempo (d)	Apariencia	Aroma	Flavour	Acidez	Balance	Aceptabilidad general
0	6,5 ±0,7	7 ±0	8,25 ±1,1	7 ±0	7,5 ±0,7	7,5 ±0,7
30	6,5 ±0,7	7 ±0	7,5 ±0,7	7 ±1,4	7,5 ±0,7	7,5 ±0,7
60	7 ±0	6 ±0	6,5 ±0,7	6 ±1,4	7 ±0,7	6,5 ±0,7
90	6 ±0	6 ±1,4	5 ±0,7	5 ±0,0	5,5 ±0,7	6,5 ±0,7

En cuanto al descriptor de apariencia evaluado, caracterizado principalmente por el color, puede apreciarse que la cerveza con el agregado de calafate obtuvo altos puntajes, resaltando que el color invitaba a tomar esta cerveza, resultando atractiva y “llamativa”. Esta característica se mantuvo aceptable durante el almacenamiento.

El aroma a fruta fue mencionado como un muy buen complemento a la cerveza base, añadiendo frescura en un principio el cual cambiaba a fruta madura o carácter a “mermelada” hacia el día 90 de almacenamiento. Mientras el aroma de la cerveza sin agregado de fruta resultó con leves cambios durante el almacenamiento.

Si bien al flavour, en ambas cervezas fue disminuyendo durante el almacenamiento, en la cerveza con agregado de calafate esta disminución fue menor y posterior a la cerveza base. La acidez fue más balanceada y compleja con el agregado de fruta, contrastándola con una acidez más sencilla en la cerveza base, la cual sólo correspondía a una acidez láctica que se incrementó a lo largo del almacenamiento.

Los balances de ambas cervezas fueron muy buenos, la cerveza con agregado de calafate presentó un mejor balance durante todo el almacenamiento.

En cuanto a la aceptabilidad general, ambas cervezas fueron bien aceptadas.

Tabla 6: Imágenes de las cervezas sin y con agregado de calafate a los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento.

Tipo de cerveza		
Tiempo (d)	Cerveza base (Berliner Weisse)	Cerveza base con calafate (Fruit Beer)
0		
30		
60		
90		

5. CONCLUSIONES

El agregado de frutos de calafates permitió obtener una cerveza con elevadas cualidades organolépticas y antioxidantes dependiendo de la cantidad de fruto adicionado sin alterar las características fisicoquímicas.

El análisis sensorial con jueces entrenados, otorgó mayores puntajes a la cerveza con agregado de calafate, no sólo en el momento inicial sino también a lo largo del almacenamiento.

Los resultados del panel sensorial con consumidores fueron muy positivos para ambas cervezas, la cerveza con fruta fue muy bien aceptada siendo importante resaltar que la mayoría no había consumido anteriormente cervezas de este tipo.

Los análisis de pH, acidez y densidad no presentaron grandes diferencias durante el almacenamiento en ambas cervezas.

El contenido de antioxidantes de la cerveza con agregado de calafates, duplicó al de la cerveza base.

Puede concluirse que es factible obtener una cerveza estilo "Fruit beer" con agregado de calafate a partir de una cerveza sour, ya que no sólo mejora las características organolépticas de la misma, sino que aumenta su capacidad antioxidante y la calidad sensorial sin modificar sus características fisicoquímicas incluso durante un almacenamiento en botella durante tres meses a 5° C.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado con fondos del PICT 3690-2015-Préstamo BID, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCyT.

Se agradece a la fábrica de cerveza Laurus S.R.L. por su buena predisposición a colaborar con este trabajo, así como por prestar sus equipos e instalaciones para la elaboración de la cerveza.

6. BIBLIOGRAFÍA

-Ablin, A. 2014. El mercado de la cerveza. Informe sectorial N°3, abril 2014. Área de Sectores Alimentarios-Dirección de Agroalimentos, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en:

http://www.alimentosargentinos.gov.ar/HomeAlimentos/AyB/bebidas/Informes/Cerveza_03_2014_04Abr.pdf

(Ultimo acceso marzo 2020).

-Aguilera Ortíz, M., Reza Vargas, M.C., Chew Madinaveitia, R.G., Meza Velázquez, J.A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, XIII, 16-22.

-Akbulut M, Ir, S. C., Lu T. M. 2009. Some physicochemical and nutritional properties of barberry (*Berberis vulgaris* L.) fruits. J. Food Proc. Eng. 32, 497-511.

-Alonso, J., Desmarchelier, C. 2006. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Fitotecnia Ed. 680 p. Buenos Aires, Argentina.

-Arena, M. E., Curvetto, N. 2008. *Berberis buxifolia* fruiting: Kinetic growth behavior and evolution of chemical properties during the fruiting period and different growing seasons. Sci. Hortic. 118, 120-127.

-Arena, M. E., Postemsky, P., Curvetto, N. R. 2012. Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. N.Z. J. Bot. 50, 15-28. <http://dx.doi.org/10.1080/0028825X.2011.638644>

-Arena, M. E., Zuleta, A., Dyner, L., Constenla, D., Ceci, M., Curvetto, N. R. 2013. *Berberis buxifolia* fruit growth and ripening: evolution in carbohydrate and organic acid contents. Sci. Hortic., 52-58.

-Arena, M. (2018). El rol de los factores epigenéticos en la calidad nutracéutica de los frutos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.) de la Patagonia.

-Bravo, A., Herrera, J. C., Scherer, E., Ju-Nam, Y., Rübsum, H., Madrid, J., Rangel-Aldao, R. 2008. Formation of α -dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner. J. of agric. and food Chem., 56, 4134-4144.

-Bottini, M.C.J., Bustos, C., Bran, D. 1993. Arbustos de la Patagonia, Calafates y Michay. Presencia 8, 5-9.

-Bottini M C J, Greizertein E J, Aulicino M B, Poggio L. 2000. Relationships among genome size, environmental conditions and geographical distribution in natural populations of NW Patagonian species of *Berberis* L. (Berberidaceae). Ann Bot 86: 565-573.

-De Gaetano, G., Costanzo, S., Di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A. A., ... Pounis, G. 2016. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 26, 443-467. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007>

-Delvaux P., Depraetere, S., Delvaux F., Delcour J.A. 2003. Ambiguous Impact of Wheat Gluten Proteins on the Colloidal Haze of Wheat Beers, J. of the Amer. Soc. of Brewing Chem., 61:2, 63-68, DOI: [10.1094/ASBCJ-61-0063](https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0063)

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. 2011. InfoStat. Software Estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de: <https://www.infostat.com.ar>
- Durst, R. W., Wrolstad, R. E. 2001. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. Current protocols in food analytical chemistry, F 1-3.
- Gerhäuser, C. 2009. Phenolic Compounds in Beer. Beer in Health and Disease Prevention, published by Elsevier.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochem. Eng. J., 14, 217-225.
- Goiris, K., Jaskula-Goiris, B., Syryn, E., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., De Cooman, L. 2014. The flavoring potential of hop polyphenols in beer. J. of the Amer. Soc. of Brewing Chem. 72, 135-142.
- González-San Jose, M.L., Muñiz, P., Valls, V. 2010. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud. Monografía.
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanuand, G., Aprodu, I. 2020. Value-Added Lager Beer Enriched with Eggplant (*Solanum melongena*L.) Peel Extract. Molecules, 25, 731.
- Jaskula-Goiris, B., Goiris, K., Syryn, E., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., De -Cooman, L. 2014. The use of hop polyphenols during brewing to improve flavor quality and stability of pilsner beer. J. of the Amer. Soc. of Brewing Chem., 72, 175-183.
- Jurková, M., Horák, T., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., & Kellner, V. 2012. Control of antioxidant beer activity by the mashing process. J. of the Institute of Brewing, 118, 230-235.
- Li, H., Zhao, M., Cui, C., Sun, W., Zhao, H. 2016. Antioxidant activity and typical ageing compounds: their evolutions and relationships during the storage of lager beers. International Journal of Food Scie. & Technol., 51, 2026-2033.
- Martínez, A., Vergara, S., Herranz-López, M., Martí, M., Valero, M., Micol, V., Saura D. 2017. Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer. J. Inst. Brew. 123, 58-65.
- Moghaddam, P. R., Fallahi, J., Shajari, M. A., Mahallati. 2013. Effects of harvest date, harvest time, and post-harvest management on quantitative and qualitative traits in seedless bar - berry (*Berberis vulgaris* L.). Indust. Crop Prod. 42, 30-36.
- O'connell, J. E., Fox, P. F. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. Inter. Dairy J. 11, 103-120.
- Pachas, J.C. 2019. Contenido de Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cervezas artesanales e industriales. Peruvian Agric. Res. 1, 27-30.
- Parzanese, M. 2013. Revista Alimentos Argentinos N° 59: "Té, más allá de la taza".pp 63.Disponible en <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=209> (Último acceso marzo 2020).
- Pino, M.T., Zamora, O., Mc Leod, C., Águila, K., Ojeda, A., Vergara, C. 2018. Calafate: propiedades del fruto y su potencial como ingrediente Ministerio de Agricultura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias - INIA Kampenaike N° 781.

-Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., Valls-Belles, V., Codoñer, P., Muñiz, P. 2005. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3637-3642.

-Rodoni, L. M., Feuring, V., Zaro, M. J., Sozzi, G. O., Vicente, A. R., Arena, M. E. 2014. Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*) *Sci. Hortic.* 179, 233-238.

-Ruiz, A., Hermosin-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Hertlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., Von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. *J Agric Food Chem*, 58, 6081-6089.
<https://doi.org/10.1016/j.jwt.2019.01.002>

-Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. 2006. The chemistry of beer aging, a critical review. *Food Chem.*, 95, 357-381.

-WHO/FAO. 2004. Disponible en:

http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf

(Último acceso marzo 2020).