

# Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo

*Octubre 2001*

**M.L. González San José**  
**P. Muñiz Rodríguez y**  
**V. Valls Bellés**

*Departamento de Biotecnología y Ciencia  
de los Alimentos. Universidad de Burgos*  
*Departamento de Pediatría, Ginecología  
y Obstetricia. Universidad de Valencia*



8



# SUMARIO

## Actividad antioxidante de la cerveza: Contribución de la fracción fenólica

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
	1.1. Generalidades sobre los antioxidantes de la cerveza .....	4
	1.2. La actividad antioxidante global .....	5
	1.3. El estrés oxidativo en los sistemas biológicos .....	7
	1.4. Papel de los alimentos en la defensa antioxidante .....	13
	1.5. Efectos de los polifenoles en los sistemas biológicos .....	14
	1.6. Compuestos fenólicos de la cerveza .....	15
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	20
	2.1. Materiales y métodos .....	20
	2.1.1. Cervezas analizadas .....	20
	2.1.2. Determinación de las familias fenólicas .....	20
	2.1.3. Determinación de azúcares reductores totales .....	20
	2.1.4. Análisis de los compuestos fenólicos pormenorizados: Fraccionamiento de las cervezas .....	21
	2.1.5. Método de determinación de la actividad antioxidante .....	22
	2.1.6. Aislamiento de células hepáticas .....	22
	2.1.7. Pruebas de viabilidad de hepatocitos aislados .....	22
	2.1.8. Planteamiento experimental para el estudio antioxidante de la fracción 3 de la cerveza en los hepatocitos aislados de rata .....	23
	2.1.9. Determinación de la actividad lactadeshidrogenasa (LDH) .....	23
	2.1.10. Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	24
	2.1.11. Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas .....	24
	2.1.12. Determinación de la concentración de adenosin trifosfato(ATP) .....	24
	2.1.13. Determinación del Glutation Reduction (GSH) .....	25
	2.1.14. Análisis estadístico .....	25
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
	3.1. Actividad antioxidante global (AAO) .....	26
	3.2. Familias fenólicas y azúcares reductores .....	29
	3.3. Correlación actividad antioxidante y familias fenólicas .....	34
	3.4. Actividad antioxidante global de las fracciones .....	37
	3.5. Composición fenólica pormenorizada .....	40
	3.6. Correlación fenoles pormenorizados y la AAO .....	42
	3.7. Viabilidad Celular: actividad lactato deshidrogenasa (LDH) .....	43
	3.8. Peroxidación lipídica: Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	44
	3.9. Niveles de adenosin trifosfato (ATP) .....	46
	3.10. Daños a proteínas: grupos carbonilo .....	48
	3.11. Reserva de la capacidad antioxidante: Niveles de Glutation Reducido .....	50
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	52
	• <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53

Este trabajo ha sido realizado  
por el siguiente grupo de  
investigación:

- *Dra. M<sup>a</sup> Luisa González*  
*San José*
- *Dra. P. Muñiz Rodríguez*
- *Dra. Silvia Pérez Magariño*
- *Dña. Dolores Rivero Pérez*

*del Dpto. de Biotecnología y  
Ciencia de los Alimentos de la  
Universidad de Burgos, y*

- *Dra. Victoria Valls*
- *Dña. M<sup>a</sup> del Carmen Torres*  
*Rodríguez*
- *Dña. Laura Boix García*
- *Dra. Pilar Codoñer*

*del Dpto. de Pediatría,  
Ginecología y Obstetricia de la  
Universidad de Valencia*

## 1

La cerveza es una bebida alcohólica de baja graduación resultante de fermentar mediante levadura seleccionada el mosto procedente de malta de cebada, sólo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, cocción y aromatizado con flores de lúpulo.

Los constituyentes de la cerveza provienen de sus cuatro principales materias primas, malta, lúpulo, agua y levadura. El principal componente de la cerveza es el agua, que se acompaña de otros compuestos como etanol, ácidos, compuestos nitrogenados, carbohidratos, sales minerales, vitaminas, sustancias espumantes, sustancias aromáticas y compuestos fenólicos.

Los polifenoles son un grupo de compuestos de especial interés en la cerveza, ya que son responsables de diversas propiedades funcionales. Estos compuestos son importantes para los cerveceros debido a su influencia en la estabilidad coloidal de la cerveza, siendo responsables del enturbiamiento originado por la interacción con las proteínas de la cerveza. Además, estos compuestos desempeñan un papel importante en las características sensoriales (color, aroma, sabor) y nutricionales.

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años, han puesto de manifiesto el poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos presentes en distintas bebidas y frutas. Éste se asocia a su capacidad de capturar radicales libres, que hace que presenten un efecto positivo frente a distintas perturbaciones de la calidad de los alimentos e, incluso, de la salud. En este último sentido, son numerosos los trabajos que muestran su efecto protector frente a determinadas enfermedades como alteraciones cardiovasculares y cancerígenas.

El principal objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la actividad antioxidante de las cervezas tanto por ensayos químicos como biológicos. De los datos publicados, parece ser que los compuestos fenólicos presentes en ellas deben contribuir en mayor o menor grado a este poder antioxidante. Por ello, se plantea también la evaluación del contenido fenólico de las mismas, para así conocer su contribución al poder antioxidante global.

### 1.1. GENERALIDADES SOBRE LOS ANTIOXIDANTES DE LA CERVEZA

Las sustancias con actividad antioxidante presentes en la cerveza provienen esencialmente de las materias primas empleadas en su elaboración, estando ya pre-

senten en aquéllas u obteniéndose por modificación y transformación de sus constituyentes. Según estudios previos sobre la actividad antioxidante de los componentes de los alimentos, los constituyentes de la cerveza potencialmente activos son esencialmente:

- *Determinados carbohidratos que actúan como azúcares reductores y ejercen una actividad antioxidante, al menos desde un punto de vista químico.*
- *Algunas sustancias aromáticas que, además, contribuyen al aroma y al sabor, entre ellas se encuentran productos de la reacción de Maillard originados durante el malteado y posteriormente en los procesos de extracción y cocción, así como sustancias extraídas del lúpulo.*
- *Vitaminas del grupo B y ácido fólico que proceden de la malta y cuya concentración suele aumentar durante la germinación de la cebada.*
- *Los compuestos fenólicos, procedentes de la malta y del lúpulo.*

## 1.2. LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE GLOBAL

Durante años, en el ámbito de los alimentos se ha definido a los agentes "antioxidantes" como aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas (Chipault, 1962).

En este sentido, los antioxidantes naturales presentes en cervezas ejercen, entre otras, una función protectora de la calidad sensorial de la cerveza, evitando deterioros oxidativos de su calidad. Así, se ha descrito su potencial protector ante la degradación oxidativa del ácido linoleico que da lugar a la generación de trans-2-nonenal y muchos otros aldehídos volátiles responsables de un sabor a "cartón" en el producto final (Noel et al., 1999).

Basados en esta capacidad se han desarrollado distintos métodos de evaluación de la que se denomina actividad antioxidante global, generalmente basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres o en la evaluación de su capacidad reductora, constituyendo el grupo de "métodos químicos". Estos métodos ofrecen información muy diversa a la que aportan aquéllos basados en medidas biológicas o metabólicas que determinan o eva-

lúan capacidades antioxidantes específicas. La información que aportan ambos métodos es complementaria, pero dada su particular naturaleza no tienen porqué estar correlacionados los resultados de ambos métodos. De hecho, los métodos "químicos" permiten, en general, obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo permiten ligeras aproximaciones a sus efectos protectores de la salud, que son evaluados por los métodos biológicos. Además, se considera importante señalar que existen bastantes discrepancias entre autores a la hora de establecer correlaciones entre ambos grupos de ensayos. Por ello, debe considerarse que un estudio completo de la actividad antioxidante de un producto debe abarcar ambos grupos. Y es evidente que cualquier intento de extrapolación de datos de actividad protectora de la salud debe partir principalmente de los ensayos biológicos.

Sea cual sea el método a aplicar, biológico o químico, para una correcta interpretación de la acción de un determinado antioxidante, es necesario diseñar o escoger el método atendiendo a los siguientes parámetros o acciones:

- *Especificar el sustrato oxidable que será protegido por el correspondiente antioxidante.*
- *Determinar el parámetro que permitirá la medida correcta del grado de oxidación y de la inhibición ejercida por el antioxidante, así como determinar el punto final de la oxidación.*
- *Asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes.*
- *Determinar algún posible efecto pro-oxidante de los antioxidantes.*

Además, en el caso de alimentos debe tenerse en cuenta que la actividad antioxidante es dependiente de una multitud de factores, incluidas las propiedades coloidales de los sustratos, las condiciones y etapas de oxidación, así como la posible localización de los antioxidantes y sustratos en las distintas fases presentes en el alimento.

### ■ Métodos para la evaluación de la actividad antioxidante global

Los trabajos publicados al respecto datan en su mayoría de finales de los años noventa. A continuación se expone una breve relación de ellos.

- a) *Ensayo TRAP (del inglés total radical-trapping parameter Wayner et al, 1985). Actualmente casi no se emplea.*
- b) *Captura del anión superóxido (Kannen et al 1987). No se ha encontrado buena correlación con la capacidad preventiva de la oxidación lipídica.*
- c) *Método del radical 2,2-diphenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Kaneda et al, 1995). Limitado por su reproducibilidad inter-ensayos.*
- d) *Ensayo FRAP, (del inglés ferric-reducing antioxidant power), (Benzie et Strain, 1996). Mide la capacidad de reducción que no refleja necesariamente la actividad antioxidante.*
- e) *Método ORAC, (del inglés oxygen radical absorbance capacity) (Cao 1997). Cada antioxidante analizado presenta comportamientos muy dispares.*
- f) *Método del 3-etilbenzotiazoline-6 sulfonato (ABTS) (Re et al 1999). La capacidad de captura de radicales libres en este método no es un reflejo de su verdadera actividad antioxidante.*
- g) *Método del N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) (Fogliano et al 1999). Método con alta reproducibilidad inter-ensayo, útil para medios no lipídicos.*

Desafortunadamente muchos de estos métodos han sido desarrollados para aplicarse en medios lipídicos y, por tanto, no son adecuados para un producto como la cerveza.

### 1.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (Davis, 1995), representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que entraña un peligro potencial debido a las especiales características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidos como especies oxigénicas reactivas (ROS).

Las especies oxigénicas reactivas son radicales libres (RL), es decir especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas, lo que les confiere una alta e indiscriminada reactividad.

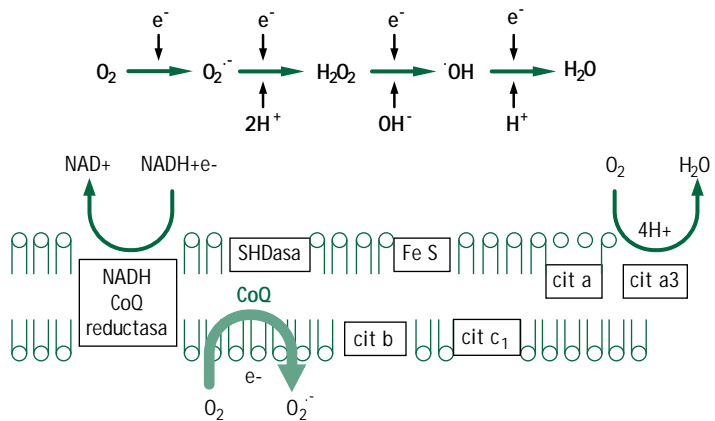


Entre las especies oxigénicas cabe destacar:

- 1 **Radicales:** ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), alcoxilo ( $RO\cdot$ ), peróxido ( $ROO\cdot$ ) y óxido de nitrógeno ( $NO\cdot$ )
- 2 **No radicales:** peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $\cdot O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

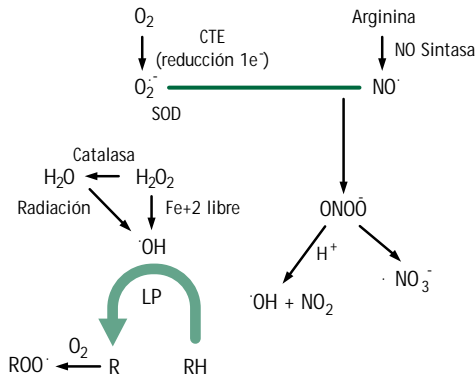
Las especies oxigénicas reactivas tienen un origen tanto endógeno, de la propia célula, como exógeno. Entre las fuentes endógenas destacan:

- 1 *La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Debe señalarse que el 95% del oxígeno que respiramos es reducido a  $H_2O$  por la acción de la citocromo oxidasa-a-3, último eslabón de la cadena de transporte electrónico. Además, a nivel del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol, el (Q10) actúa como aceptor de electrones dando origen a la formación de radicales  $O_2$ , según los esquemas siguientes:*



- 2 *Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido de nitrógeno ( $NO\cdot$ ), por acción de la óxido-nítrico-sintasa sobre la arginina*

intracelular. La combinación del  $O_2^{\cdot-}$  con el  $NO^{\cdot}$  da lugar a la formación del  $ONOO^{\cdot}$ - capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas. El conjunto de reacciones implicadas se muestran a continuación:



- 3 La autooxidación de compuestos de carbono reducido como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos radicales.
- 4 La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de esta producción (Fridovich, 1976).

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

- Ambientales - Radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.
- Farmacológicas - Xenobióticos, drogas, etc.
- Nutricionales - Contaminantes, aditivos, etc.

Junto a los radicales del oxígeno existen otros derivados centrados en átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, etc., que indiscutiblemente contribuyen a la propagación y mantenimiento de nuevas reacciones conducentes a la formación de radicales.



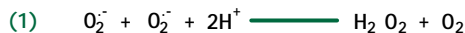
### ■ Daño oxidativo a biomoléculas

Son muchas las especies oxigénicas que actúan como oxidantes biológicos, pero el  $O_2^{\cdot-}$  es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de  $HO_2^{\cdot}$ , convirtiéndose en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen del modo siguiente:



El  $O_2^{\cdot-}$  no es particularmente reactivo con lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada con determinadas proteínas. Esta evidencia constata que el  $O_2^{\cdot-}$  reacciona tan sólo con proteínas que contienen metales en su grupo prostético.

Una de las reacciones más importantes del  $O_2^{\cdot-}$  son las reacciones de dismutación actuando a la vez como reductor y oxidante. La dismutación depende de la acción catalítica de la superóxido dismutasa (SOD), siendo el  $H_2O_2$  el intermediario común en todas ellas. Actúa como oxidante en la mayoría de moléculas, especialmente en las que contienen grupos SH o Fe-Sulfuro. Reacciona con metales de transición dando lugar a la generación del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), (Haber-Weiss, 1939 y previamente, Fenton, 1894), según el esquema siguiente:



Las especies oxigénicas reactivas producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular, así actúan:

1 *Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).*



La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , que en reacciones posteriores catalizadas por la catalasa o por la GPx se detoxificará formando  $H_2O$  y  $O_2$ . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su principal función es eliminar el  $H_2O_2$  generado en la beta-oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degradará el  $H_2O_2$  citoplasmático. La DT-diaforasa, cataliza la reducción de quinona a quinol y participa en la reducción de drogas de estructura quinónica (Muñiz et al., 2000).

#### *Sistema no enzimático*

Las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes o "scavengers" (captadores de radicales libres), como son: vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, ferritina, ceruloplasmina, selenio, glutatión reducido (GSH), manganeso, ubiquinona, zinc, ácido úrico, flavonoides, como más representativos e importantes. Dentro de ellos, cobran en la actualidad especial importancia los flavonoides extraídos de determinados alimentos. Su acción dependerá en ocasiones de la interacción directa de la especie reactiva para rendir complejos estables o de menor reactividad, mientras que en otras ejerce de cosustrato en la acción catalítica de algunas enzimas. El GSH es el mayor tiol citosólico que puede actuar de "scavenger" del  $\cdot OH$  y como cosustrato de la GPx.

#### *Sistemas reparadores*

A su vez éstos se subdividen en dos grandes grupos, los directos y los indirectos:

- *Directo: Reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicos como la disulfuro reductasa y la sulfoxido reductasa.*
- *Indirecto: En primer lugar se reconoce el daño molecular siendo éste eliminado o degradado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y peroxidicos lipídicos de las cadenas carbonadas, como en las oxidaciones del DNA y RNA.*

#### ■ **Procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con los radicales libres**

Ante el estrés oxidativo el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente, desencadenando diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia del neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento, etc (Rice-Evans et al, 1995; Halliwell, 1996).

#### 1.4. PAPEL DE LOS ALIMENTOS EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

Tal y como indicamos, en el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos (enfermedades, envejecimiento celular, etc). Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos (Cao et al., 1998; Young et al, 1999).

En los estudios epidemiológicos realizados sobre la población europea (WHO/Proyecto Mónica, Gey et al.) se determinaron los antioxidantes plasmáticos (alfa-tocoferol, ascorbato, vitamina A, carotenoides y selenio) en 16 poblaciones con cardiopatía isquémica, observándose que la incidencia de mortalidad muestra una relación inversa con el nivel de tocoferol ( $p=0,002$ ).

Otros estudios han mostrado una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer entre otras patologías, en los países del sur de Europa, donde se consume una dieta mediterránea, frente a los países nórdicos. Este efecto ha sido atribuido especialmente a las vitaminas y compuestos fenólicos. El consumo de frutas, verduras, aceite de oliva, y determinadas bebidas como cerveza, vino y té, presentan una relación inversa con las enfermedades cardiovasculares (Gingliano, 2000). Así mismo, diversos trabajos denotan que el consumo moderado de vino y cerveza está asociado con una menor incidencia de estas enfermedades cardiovasculares.

Desde el punto de vista nutricional, la cerveza contiene más proteínas y vitaminas del grupo B que el vino. La actividad antioxidante de la cerveza es similar a la

del vino aunque sus antioxidantes específicos presentes en el lúpulo y la cebada son distintos a los de la uva (Denke, 2000).

Los flavonoides más abundantes en la dieta son los flavanoles (catequinas, proantocianidinas), las antocianinas y los productos de oxidación derivados de ellos. La principal fuente de polifenoles son: frutas y bebidas (zumos de fruta, vino, té, café, chocolate y cerveza) y en menor cantidad verduras, legumbres y cereales. La ingesta diaria de polifenoles en individuos que siguen una dieta rica en estos alimentos es aproximadamente de 1g/día. Sin embargo, en estudios de bio-disponibilidad los niveles encontrados en plasma no reflejan dichas cantidades.

Se ha observado que existe una gran variedad en la biodisponibilidad observada tanto entre polifenoles como entre individuos (Scalbert et al., 2000). En general, la biodisponibilidad está en función de la solubilidad (Hollman et al, 1997; Eastwood, 1999) y por ello los polifenoles presentan diferentes niveles de absorción en los medios biológicos (Bourne et al, 2000).

## 1.5. EFECTOS DE LOS POLIFENOLES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

En los últimos años han cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Así, es bien conocido que algunos polifenoles presentan actividad antimicrobiana, siendo el principal responsable la presencia de ácido gálico. Este ácido es un mecanismo natural de defensa en muchos frutos frente al desarrollo de enfermedades microbianas y criptogámicas (Chung y Stevens 1993). Además, se ha señalado que tienen actividad antimutagénica, algo que ha sido comprobado por diversos ensayos, como los que demuestran su capacidad de inhibir la aparición de mutaciones en bacterias como *Salmonella typhimurium* (Horikawa et al, 1994). Se ha comprobado también su capacidad para actuar de dadores de hidrógenos o quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Hertog et al., 1997), e inhiben la agregación plaquetaria. Debe tenerse en cuenta que si bien algunos polifenoles (como los aislados del té) inhiben la oxidación de las LDL "in vitro", los efectos "in vivo" son pequeños (Riemersma, 2001). Poseen actividad anticarcinogénica, actuando como inhibidores en procesos cancerígenos por ejemplo en cáncer de pecho y de ovario (Losiewicz, 1994). Tienen

también actividad anti-VIH: los sulfatos de ácido tánico, de rutina y de ácido elágitico inhiben la infección de las células T humanas tipo I-virus linfotrópicas por el VIH, (Mizumo et al. 1992). También protegen la línea celular Ht-22 y neuronas primarias de rata tras intoxicación por glutamato (Ishige et al., 2001).

Así mismo, en experimentación animal se ha estudiado el efecto de la catequina en membranas eritrocitarias y en microsomas de hígado de rata observándose una inhibición en la peroxidación lipídica, así como se ha descrito también que protegen al DNA del daño oxidativo.

Diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante en combinación que de forma aislada. Los polifenoles aislados como el galato de epigallocatequina, la quercitina, el diosmetin y el pignogenol, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica inducida en la retina bovina y porcina. En cambio la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector (Ueda et al., 1996).

## 1.6. COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CERVEZA

Los polifenoles presentes en la cerveza provienen esencialmente de la cáscara de la cebada malteada y del lúpulo. Son principalmente ácidos fenólicos como el ferúlico, gálico o siríngico; flavonoides de tres tipos, los flavanos como la familia de las catequinas, los antocianos entre los que están la pelargonidina y la malvidina (estos últimos presentes especialmente en cervezas elaboradas con frutas rojas) y derivados asociados como las calconas, y los flavonoles como la quercetina o el kaempferol. También aparecen compuestos más complejos como los taninos siendo los más importantes las proantocianidinas de diverso grado de polimerización.

Los compuestos fenólicos juegan un importante papel en las características sensoriales de la cerveza. Así, algunos de los fenoles presentes en ella contribuyen a su sabor, astringencia, color y aroma, además de ser responsables, al menos parcialmente, de la turbidez de las mismas, ya que son capaces de interactuar con las proteínas y los polisacáridos presentes en la cerveza provocando la aparición de coloides de alto peso molecular que permanecen en suspensión enturbiando el producto hasta que precipitan.

El contenido final de compuestos fenólicos en una cerveza no depende exclusivamente de las materias primas empleadas en su elaboración, sino que son muchos

los factores que pueden afectarla. La mayoría de ellos están correlacionados con las prácticas de elaboración. Algunos de los efectos de estas etapas han sido descritos por diversos autores. A continuación se describen brevemente los principales efectos de cada etapa según McMurrough et al, (1984):

- *Durante el malteado se producen pérdidas de fenoles, en mayor o menor grado dependiendo de las condiciones en que éste se lleve a cabo.*
- *La extracción, característica de la etapa de mezclado/macerado depende de la relación malta/agua y del tiempo de maceración. Una relación 1:4 o 1:5 produce niveles de fenoles superiores que cuando se utilizan mezclas más concentradas por ejemplo 1:3.*

*También se ha observado que un aumento del tiempo de mezclado supone una reducción del nivel de compuestos fenólicos (Von Narzib et al 1979), esencialmente debido a que a lo largo de esta etapa algunos de ellos se oxidan, disminuyendo principalmente el contenido de moléculas de bajo peso molecular y aumentando los compuestos oxidados.*

*Además, tiene lugar una despolimerización de las proantocianidinas dando como resultado la liberación de catequinas. Por ello, se ha encontrado un nivel superior de catequinas en el mosto que en la propia cebada (Moll et al 1984).*

- *El proceso de cocción supone un cambio en la composición de polifenoles, debido esencialmente a la adición del lúpulo. En el mosto lupulizado predominan las catequinas y epicatequinas procedentes del lúpulo y de la despolimerización de proantocianidinas de la cebada. Además se produce un aumento del contenido de flavanoles complejos y polimerizados y de los ácidos hidroxibenzoico y p-cumárico.*
- *El proceso de fermentación puede disminuir el contenido fenólico del mosto debido a la absorción sobre las levaduras, y también a la formación de polímeros fenoles-proteínas que precipitan.*
- *Durante las etapas finales de maduración y acondicionamiento se puede observar una disminución generalmente ligera del contenido de ácidos fenólicos, con la excepción del ácido vainillico que disminuye más de un 40%. Además, se puede producir una descarboxilación de ácidos fenólicos como el p-cumárico, ferúlico y sináptico (Thurston y Tubb, 1981).*

Así, los contenidos de compuestos fenólicos descritos en la bibliografía varían notablemente de unos artículos a otros, oscilando entre 50 y 350 mg/L. En general, se ha encontrado que las proantocianidinas de diverso grado de polimerización suelen ser los compuestos fenólicos predominantes, especialmente las de mayor grado de



polimerización, les siguen las catequinas así como ciertos ácidos fenólicos y algún flavonol como la quercetina, aunque sus concentraciones no suelen superar los 10 ppm. El resto de flavonoles así como otros fenoles de bajo peso molecular, alcanzan como máximo concentraciones entorno a un ppm.

La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres. El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante. Así, según Rice-Evans et al. (1996) los compuestos con mayor actividad son los de estructura flavonoidea, precisamente los mayoritarios en las cervezas, y de ellos aquellos que:

- presentan dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B, lo que confiere una alta estabilidad al radical que se forma después de la reacción de captura del radical libre.
- contienen un doble enlace 2,3 en conjugación con el 4-oxo (C=O) en el anillo C.
- aquellos compuestos que tienen grupos OH- en 3 y 5 y el grupo oxo (C=O) en 4 en los anillos A y C.

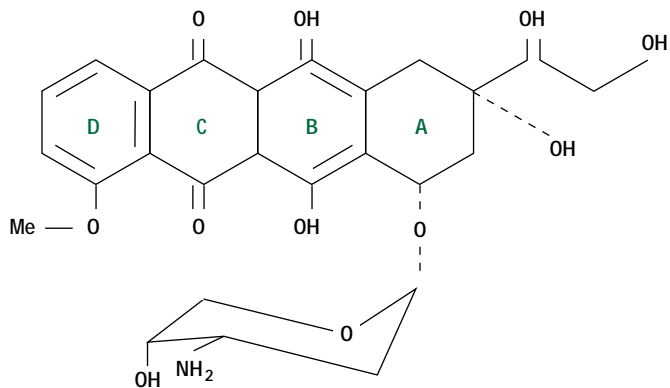
Son muchos los estudios que se han realizado con flavonoides tanto sintéticos como naturales extraídos de frutas, té y vino, pero no son tantos los realizados con fenoles aislados de la cerveza. Algunos de los datos publicados indican que los polifenoles de la cerveza inhiben la oxidación de las LDL in vitro (Miranda et al., 2000). Por otra parte, las calconas procedentes de la cerveza presentan actividad antioxidante, protegen de la peroxidación lipídica inducida por terbutilhidroperóxido, en los hepatocitos aislados de rata (Rodríguez et al. 2001).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta este momento, y sin perder de vista el objetivo principal de este trabajo, se diseña un plan de trabajo que permita evaluar la actividad antioxidante global de la cerveza, y de fracciones de la misma. Además, se plantea evaluar la presencia de distintos fenoles en las distintas fracciones. Dada la complejidad, el número de réplicas necesarias para dar resultados fiables y por tanto, la larga duración de los ensayos biológicos, se hace imprescindible seleccionar adecuadamente el material objeto de ensayo en éstos. Se tomó como criterio de selección el estudio de la fracción más rica en aquellos compuestos fenólicos que según la bibliografía tienen mayor actividad metabólica. Esta fracción, como se expone con detalle en el apartado de resultados, resultó ser la fracción 3.

Ya se ha expuesto la conveniencia de escoger un inductor de la oxidación adecuado. A continuación se exponen las características, efecto, y demás parámetros de interés relativos a la elección del inductor del estrés oxidativo en los ensayos biológicos.

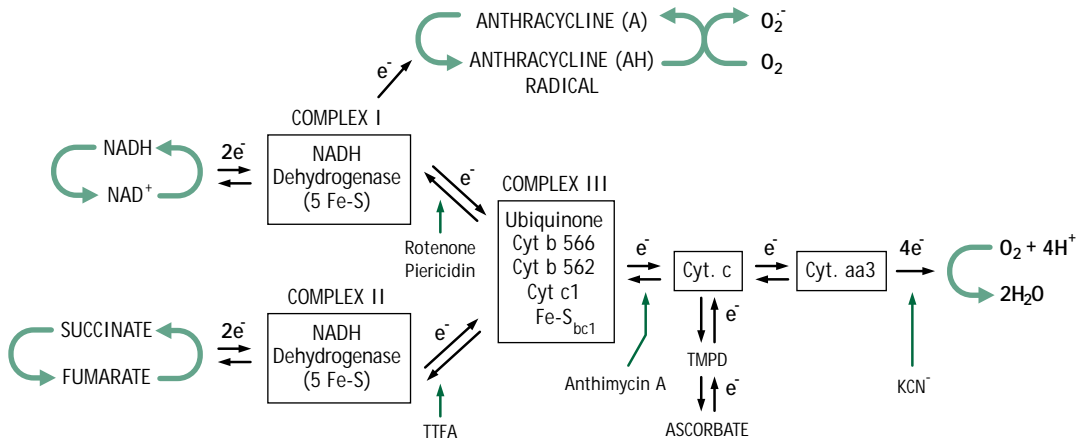
La adriamicina o doxorubicina (figura, 1) es un antibiótico quinónico que pertenece al grupo de las antraciclinas, clínicamente se usa como un potente agente neoplásico que tiene actividad terapéutica ante una gran variedad de cánceres humanos, especialmente se ha utilizado en el cáncer de mama y en las leucemias. El efecto citostático de esta droga implica la inhibición de la topoisomerasa II y RNA polimerasa II. Asimismo, se intercala entre el ADN provocando errores en la transcripción y replicación.

**Figura 1.** Estructura de la molécula de *Adriamicina*



Por otra parte, está perfectamente demostrado que el "redox cycling" de las antraciclinas se produce en el 1<sup>er</sup> complejo de la cadena de transporte electrónico (figura, 2).

**Figura 2.** Cadena de transporte electrónico y su vínculo con el ciclo redox de las antraciclinas



Por tanto, la antraciclina interacciona con un electrón del 1<sup>er</sup> complejo y da lugar a la formación de un radical que posteriormente reacciona con el O<sub>2</sub> dando lugar a la formación del ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que tras sufrir reacción de dismutación da lugar a la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que posteriormente en presencia de metales de transición como el hierro da lugar a la formación del radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) (Goodman J., et al., 1997).

Estos radicales libres o especies oxigénicas reactivas, que como ya se ha dicho ocasionan diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos estimulando, entre otras, la peroxidación lipídica e inhibiendo la función mitocondrial, serán el origen del daño celular. Este daño está implicado en los efectos secundarios de dicho antibiótico, como son alopecia, ulceración en las mucosas, cardiotoxicidad (Singal et al., 1997), además de la producción de la peroxidación lipídica tanto hepática como miocárdica y el daño al DNA (Bagchi et al., 1994).

Son muchos los compuestos estudiados para inhibir los efectos tóxicos del antibiótico, entre ellos la coenzima Q10 (Valls et al., 1994) y algunos flavonoides, tanto sintéticos como naturales (Ferté et al., 1999).

Como ya se ha comentado, en este trabajo se plantea evaluar el efecto protector de fenoles aislados de la cerveza, que no se han probado hasta el momento.

# 2

## 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1. CERVEZAS ANALIZADAS

Este trabajo se ha realizado con unas 80 cervezas comerciales representativas del mercado actual. La mayoría fueron cervezas de producción nacional, pero se incluyen también algunas cervezas extranjeras, bien por sus características peculiares o porque se consideraron con una presencia significativa entre las consumidas en los últimos años. 46 cervezas se clasificaron como "rubias", 14 formaron el grupo de las cervezas "sin alcohol", 14 se englobaron en el grupo de cervezas "negras", y 6 cervezas forman el grupo de "especiales" englobando cervezas de frutas, de trigo y una etiquetada como cerveza "ecológica".

De cada una de ellas se analizaron 3 botellas, intentando que fueran de lotes (cocidas) distintos, con el fin de que los datos encerraran la máxima variación posible.

Todos los análisis químicos se realizaron por duplicado.

### 2.1.2. DETERMINACIÓN DE LAS FAMILIAS FENÓLICAS

Las familias fenólicas Polifenoles Totales, Catequinas y Proantocianidinas se analizaron sobre las cervezas objeto de estudio, por medida directa. En todos los casos se controló la posible interferencia de la presencia de azúcares y dextrinas para evitar sobrevaloraciones.

Los Polifenoles Totales se determinaron mediante la reacción de Folin-Ciocalteu y se expresan en mg/L de ácido gálico.

Las Catequinas se evalúan por reacción de condensación con la vainillina y se expresan como mg/L de D-catequina.

Las Proantocianidinas se determinan tras su transformación en antocianidinas al calentarse en medio ácido, en presencia de oxígeno. Se expresan como mg/L de cloruro de cianidina.

La descripción de estos métodos puede encontrarse en Paroneto (1977).

### 2.1.3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

El contenido de azúcares reductores totales se evaluó basándose en su acción reductora sobre una solución de cobre (II) (Método Oficial de Análisis, Ministerio de Agricultura, 1973).

#### 2.1.4. ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PORMENORIZADOS: FRACCIONAMIENTO DE LAS CERVEZAS

La separación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en función del peso molecular, estructura química y polaridad siguiendo el método descrito por DiStefano y Cravero (1990). Este método consiste en un fraccionamiento en columna, sobre una resina de adsorción (Amberlita XAD-2 de 150-250  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula).

El fraccionamiento se consigue eluyendo con disolventes de polaridad diversa, obteniéndose las siguientes fracciones: F1 (agua); F2 (éter etílico) y F3 (metanol).

El fraccionamiento se llevó a cabo por duplicado para cada cerveza analizada.

Tras el fraccionamiento, cada fracción se llevó a sequedad evaporando el disolvente a  $T^{\text{a}} \leq 35^{\circ}\text{C}$  en rotavapor. Dependiendo del análisis que se realiza sobre la fracción el residuo se trata de un modo u otro. Así, para medir la actividad antioxidante global, se redissuelve en una de mezcla hidroalcohólica de igual graduación a la cerveza de partida. Cuando lo que se evalúa son los fenoles presentes entonces se redissuelve en 2 ml de metanol (calidad HPLC).

EL contenido en fenoles pormenorizados se llevó a cabo mediante HPLC, aplicando el método cromatográfico descrito por Pérez-Magariño et al. (1999), con ligeras modificaciones para la mejora de la resolución de los picos en las muestras de cervezas.

La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV-visible con las sustancias patrón. Además, se realizó un análisis HPLC-MS para corroborar la identidad de los compuestos, los cuales se expresaron en  $\text{mg/L}$ .

Las muestras se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ , antes de su inyección.

La obtención del sustrato para los análisis biológicos se llevó a cabo del siguiente modo. Cada vez que se preparaba extracto se hacía a partir de recolectar las fracciones de 10 procesos o separaciones en columna. Así, tras eliminar el disolvente orgánico, el residuo se redisolvió o arrastraba con agua. Este extracto acuoso se congelaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaba a  $-35^{\circ}\text{C}$  y 50 mhrs. El resultado es un producto sólido, fácilmente pesable y por tanto dosificable. Este producto se guarda en frascos saturados de  $\text{N}_2$ , para evitar su oxidación, a bajas temperaturas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), oscuridad y ambiente seco, hasta su utilización en los ensayos "in vivo".

### 2.1.5. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la actividad antioxidante de la cerveza y de las fracciones aisladas cromatográficamente, utilizando el método propuesto por Fogliano et al. (1999). La elección de este método frente a otros similares se realizó teniendo en cuenta las siguientes ventajas: mayor estabilidad del punto fijado para la medida, alta reproducibilidad interensayo, y poca sensibilidad ante los antioxidantes hidrofóbicos, reduciendo así las posibles interferencias.

Tal y como se señaló con anterioridad, éste método había sido aplicado a vinos, por ello fue necesario adecuar las condiciones de análisis a la cerveza y sus fracciones.

Optimizadas éstas, se calcularon las curvas de calibrado con soluciones estándar de Trolox (un análogo de alfa-tocoferol) y de vitamina C. Los resultados de la actividad antioxidante se pudieron expresar entonces como TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) o como CEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de vitamina C).

### 2.1.6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS

Se utilizaron ratas Wistar machos de 3-4 meses de edad y peso comprendido entre 250-300 g, alimentadas con dieta estándar IPM R-20 comercializada por la casa Letica, Barcelona. Para el aislamiento de las células hepáticas se utilizó el método de perfusión (Romero y Viña, 1983; basado en los descritos por Berry y Friend, 1969, y por Seglen, 1972).

### 2.1.7. PRUEBAS DE VIABILIDAD DE LOS HEPATOCITOS AISLADOS

Para comprobar el porcentaje de células viables en la suspensión se utilizó la técnica de exclusión del azul tripano, consistente en una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de hepatocitos con una solución de azul tripano al 0,2%, en ClNa al 0,9% (Krebs et al., 1979). De esta mezcla se deposita una gota en una cámara cuenta glóbulos de Buerke y se observó en el microscopio óptico. Las células con membrana íntegra no permiten la entrada del colorante, quedando transparentes. Las células alteradas toman una coloración azul.

El porcentaje de células viables fue superior al 85% en todos los casos, coincidiendo con otros autores (Krebs et al., 1974; Carlsen et al., 1981).

### 2.1.8. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN 3 DE LA CERVEZA EN LOS HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

Aproximadamente 80 mg de hepatocitos aislados fueron incubados en matraces de 25 ml en presencia de adriamicina o doxorubicina, suministrada por la casa (Farmacia & Upjohn, Milán), probándose diferentes concentraciones. Finalmente, una vez observados los efectos se eligió una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , en presencia/ausencia de diferentes concentraciones de extracto de cerveza, en concreto la fracción 3.

Se eligió la fracción 3 porque es la que contiene los flavan-3ol, monómeros y oligómeros de hasta al menos cuatro unidades, teóricamente los que mayor actividad antioxidante presentan según la bibliografía consultada.

Se usaron tanto extractos de cerveza rubia, como negra, por si se detectaban efectos distintos según el tipo de cerveza.

Se han estudiado barridos de concentraciones de dichos extractos desde 5 mg a 80 mg, en un volumen final de incubación de 4 mL, que contenía, además, la suspensión celular sobre una solución salina de Krebs-Henseleit de pH: 7,4.

Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a 37°C en presencia de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95/5, v/v). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se procesaron para realizar las pertinentes pruebas de estrés oxidativo, las cuales se describen a continuación.

Todas las pruebas de estrés oxidativo, pruebas de viabilidad, etc, se llevaron a cabo cada una de ellas sobre siete ratas, es decir, las réplicas en las pruebas biológicas son 7, por cada punto ensayado o estudiado.

### 2.1.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACTATODESHIDROGENASA (LDH)

La viabilidad celular tras la incubación se determinó por medida de la LDH liberada al medio extracelular (Bergmeyer y Bernt, 1974). Se utilizó la técnica de Haka-la, descrita por dichos autores y basada en la conversión de piruvato en lactato.

La oxidación del NADH medida espectrofotométricamente a 340 nm por unidad de tiempo y a 25°C es equivalente a la cantidad de LDH de la muestra. Paralelamente se realizó un control, tratando a las células con digitonina 10 mg/ml y se cuantificó la cantidad LDH total en las mismas.



### 2.1.10. DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para determinar los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico se siguió la técnica de Stacey y Priestly (1987). Ésta se basa en añadir a 0,4 ml de una suspensión celular de hepatocitos, 1 ml de ácido tricloroacético y 2 ml de ácido tiobarbitúrico cuyas concentraciones son 20% y 0,67% (p/v) respectivamente. De esta manera, se forma un complejo entre el tiobarbitúrico y los productos de la peroxidación lipídica.

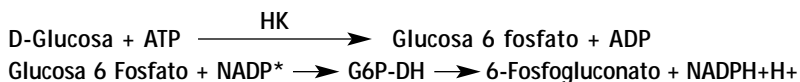
Tras incubar a 100°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se centrifuga a unas 500 rpm. El sobrenadante se mide espectrofotométricamente a 535 y 520 nm, la diferencia de absorbancias es proporcional a la cantidad de MDA liberado al medio.

### 2.1.11. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS CARBONILO DE LAS PROTEÍNAS

Los grupos carbonilo fueron determinados mediante la técnica de Levine et al.,(1990), en la que: 1 ml de suspensión celular se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos, se toman 0,2 ml de sobrenadante y se añade 0,4 ml de di-nitrofenilhidracina 10 mM. Posteriormente se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se añade tricloroacético al 20% y se realizan diferentes lavados con etanol- acetato de etilo 1:1 (v/v). Finalmente se añade 1 ml de guanidina y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se mide espectrofotométricamente a 373 nm.

### 2.1.12. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSIN TRIFOSFATO (ATP)

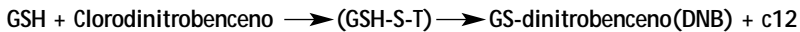
Para la determinación del ATP se utilizó el método descrito por Lamprecht y Trautschold (1974), basado en las siguientes reacciones acopladas:



La formación de NADPH medida espectrofotométricamente a 340 nm es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

### 2.1.13. DETERMINACIÓN DEL GLUTATION REDUCIDO (GSH)

La cuantificación del GSH se llevó a cabo mediante la técnica de Brigelius et al., (1983), de la glutation-s-transferasa (GSH-S-T).



El GS- DNB absorbe luz a una longitud de onda de 340 nm, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra.

### 2.1.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las distintas repeticiones enunciadas en los respectivos apartados ponen de manifiesto que se obtuvieron datos suficientes como para poder aplicar distintos tratamientos estadísticos, los cuales se llevaron a cabo con el programa Statgraphics Plus para Windows (Manugistics Inc, 1997).

Los datos se someten a distintos tratamientos estadísticos con el fin de obtener la mayor información posible, y para su mejor interpretación. Así se llevaron a cabo análisis comparativos ANOVA y LSD, o t-Students, para determinar diferencias significativas entre grupos y se recurrió al análisis de correlación lineal simple para estudiar las relaciones entre las variables.

### 3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE GLOBAL (AAO)

La actividad antioxidante global de las cervezas analizadas oscila entre los valores mínimos y máximos de 2 y 56 mg CEAC, o entre 20 y 190 mg TEAC. Estos rangos fueron similares en los cuatro grupos o tipos de cervezas estudiados, como puede verse en la figura 3.

La máxima actividad la mostraron dos cervezas especiales correspondientes a dos cervezas con frutas rojas. Ellas son las responsables de que en el análisis de la varianza (ANOVA) se detecte efecto factor "tipo cerveza", dando diferencias significativas (test LSD de Fisher) entre este grupo y los demás, que entre sí son estadísticamente iguales (Tabla I).

**Tabla I.** Valores medios de la actividad antioxidante global por tipos de cervezas.

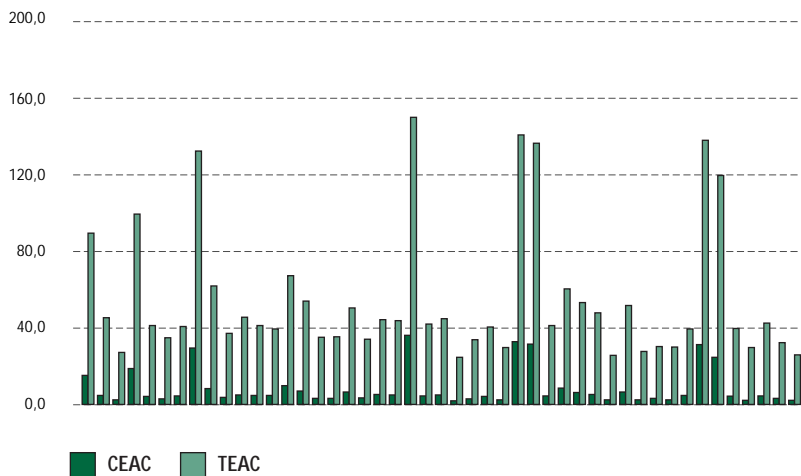
Parámetro	TIPO DE CERVEZA			
	Rubias	Sin	Negras	Especiales
CEAC	8,79 a	10,57 a	6,62 a	21,73 b
TEAC	55,34 a	62,11 a, b	46,94 a	89,36 b

Valores con igual letra, por filas, no presentan diferencias estadísticamente significativas para  $p = 0.05$

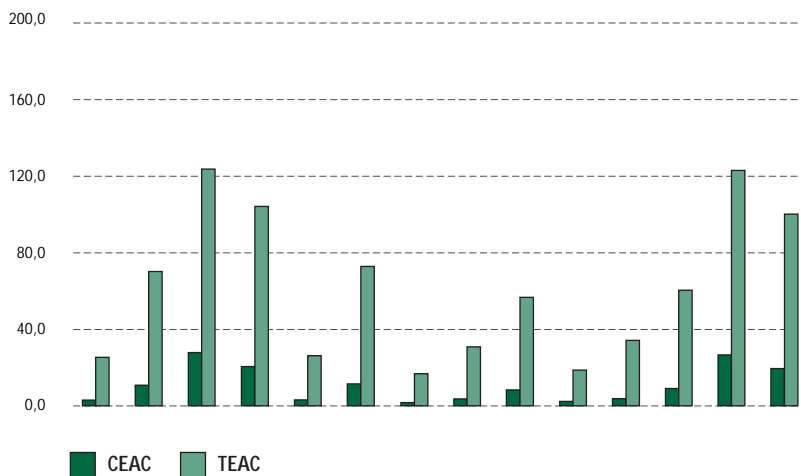
Estos resultados indican que la cerveza es un producto con una capacidad antioxidante significativa, con valores próximos a otras bebidas alcohólicas como los vinos, e incluso semejantes a algunas bebidas analcohólicas como mostos, algunos néctares o ciertas bebidas refrescantes. Además, esta actividad parece, en principio, independiente del tipo de cerveza, pudiéndose encontrar, dentro de cada grupo de cervezas, individuos con valores de AAO importantes.

**Figura 3. Actividad antioxidante Global de las cervezas por grupos**

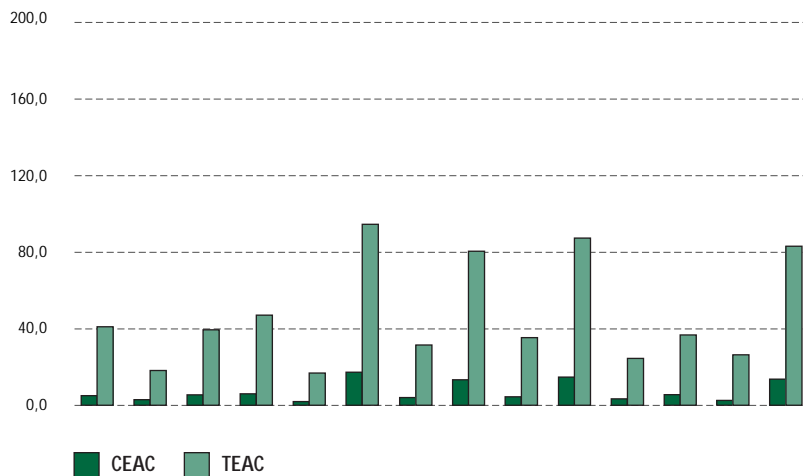
*Cervezas Rubias*



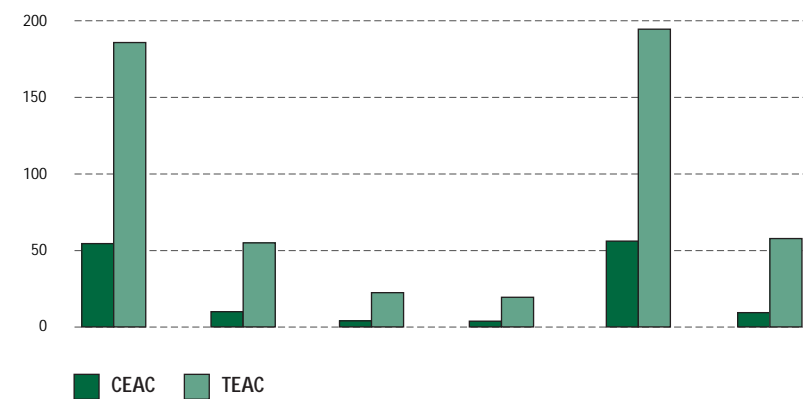
*Cervezas Sin*



*Cervezas Negras*



*Cervezas Especiales*



### 3.2. FAMILIAS FENÓLICAS Y AZÚCARES REDUCTORES

Los resultados obtenidos del contenido de las familias fenólicas analizadas en cada cerveza se muestran gráficamente en las figuras 4 y 5.

En cada uno de los grupos analizados se encontraron valores muy variables del contenido fenólico. Sin embargo, y a pesar de esta variabilidad intra-grupo, se detectó un efecto factor tipo de cerveza (ANOVA), presentando casi todos los grupos valores medios estadísticamente distintos respecto a polifenoles totales (PT) y catequinas (CAT), tal y como se refleja en la tabla II. Por el contrario, la variabilidad intra-grupo anula este efecto respecto al contenido de proantocianidinas (PRO), cuyos niveles son estadísticamente distintos únicamente para el grupo de cervezas especiales, de nuevo debido al alto nivel de proantocianidinas detectados en las dos cervezas de frutas, que presentan, con diferencia, los valores mayores. Estos resultados son fácilmente explicables teniendo en cuenta que los frutos rojos (los usados en la elaboración de estas cervezas, arándanos y cerezas) son muy ricos en proantocianidinas las cuales se extraen con facilidad durante su maceración en la cerveza.

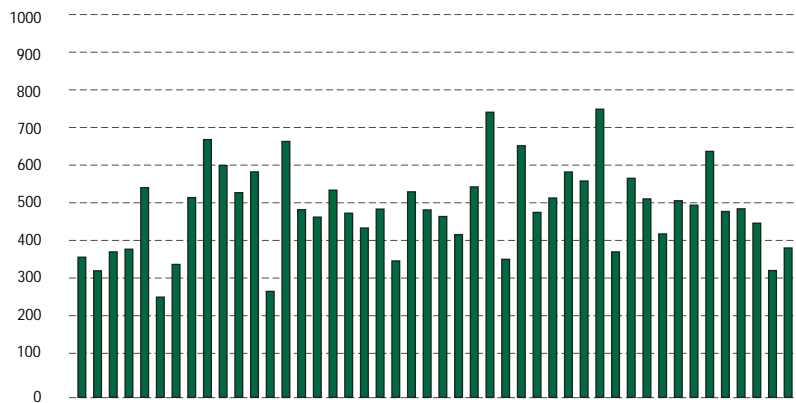
**Tabla II.** *Valores medios de las familias fenólicas indicadas y de los azúcares reductores totales por grupos de cervezas.*

Parámetro	TIPO DE CERVEZA			
	Rubias	Sin	Negras	Especiales
PT mg/L	482, 2 b	263,2 a	610,1 c	620,0 c
PRO mg/L	93,54 a	95,46 a	113,65 a	162,63 b
CAT mg/L	21,85 b	12,60 a	30,99 c	22,18 a, b, c
Az. Reductores	8,63 a	17,52 c	8,23 a	12,40 b

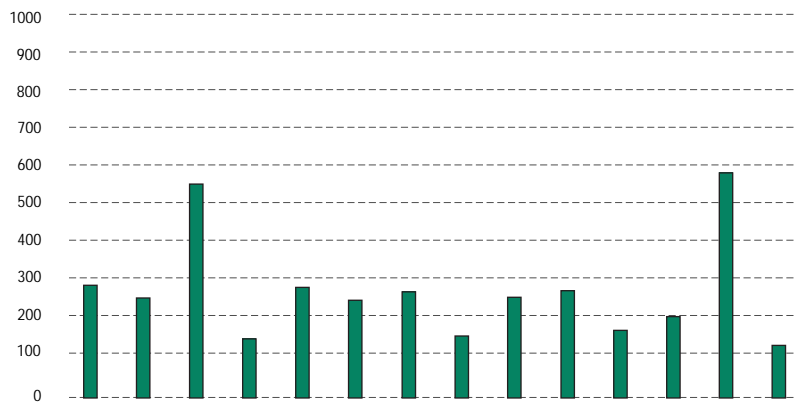
Valores con igual letra, por filas, no presentan diferencias estadísticamente significativas para  $p = 0.05$

**Figura 4.** *Contenidos de polifenoles totales de las cervezas por grupos*

**Polifenoles Totales**



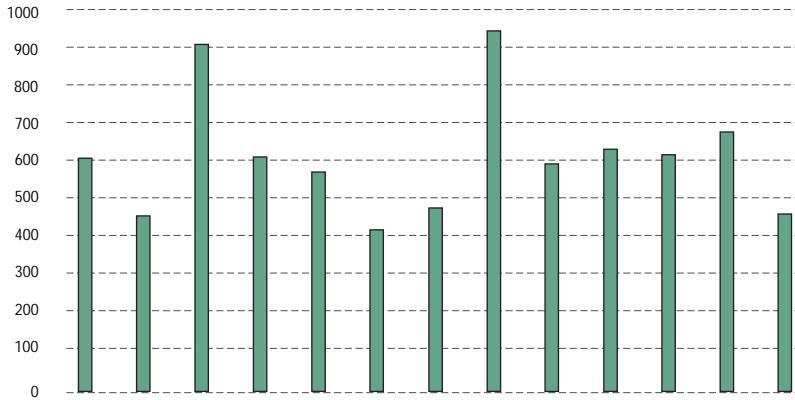
**CERVEZAS RUBIAS**



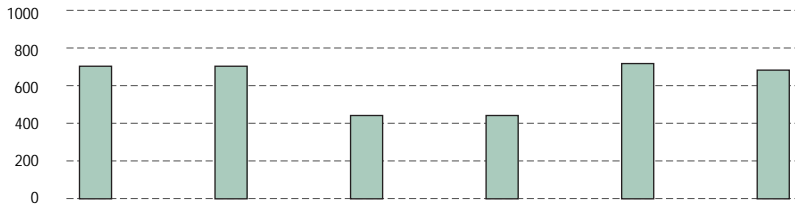
**CERVEZAS SIN**



*Polifenoles Totales*



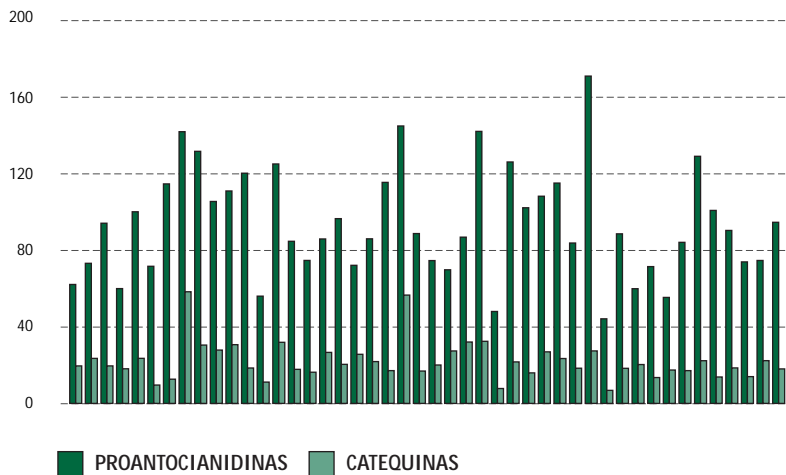
CERVEZAS NEGRAS



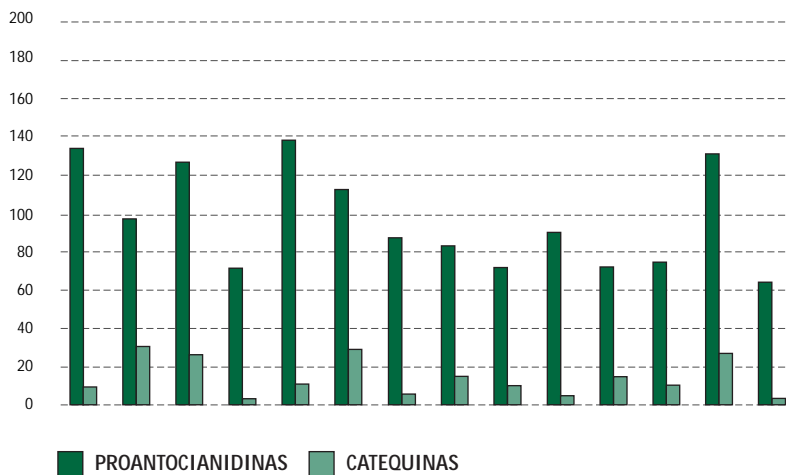
CERVEZAS ESPECIALES

**Figura 5.** *Contenidos de catequinas y proantocianidinas de las cervezas por grupos*

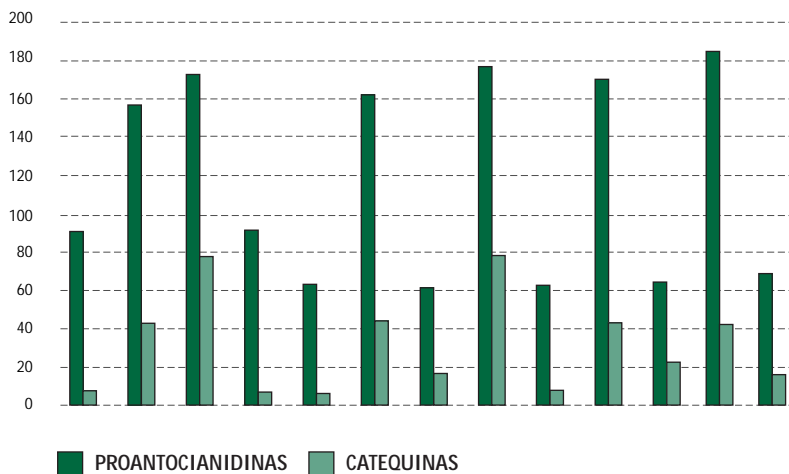
*Cervezas Rubias*



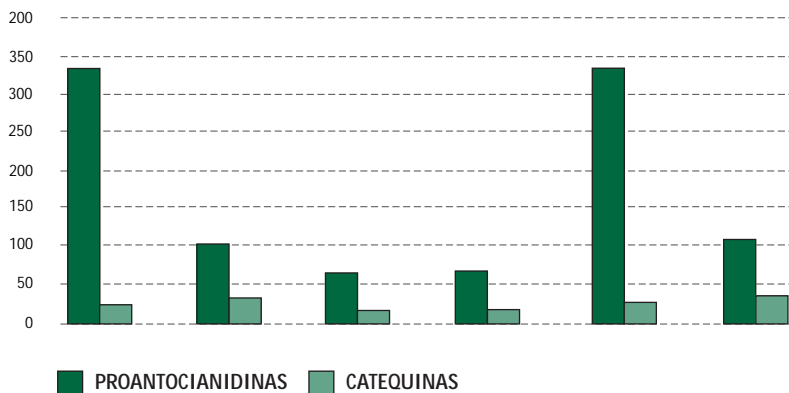
*Cervezas Sin*



*Cervezas Negras*



*Cervezas Especiales*



Si se exceptúan las cervezas de frutas, las cervezas negras presentaron los mayores niveles de compuestos fenólicos, que pueden ser debidos a una mayor extracción de compuestos desde la malta, favorecida por el grado de tostado, o bien a una mayor extracción desde el lúpulo, ya que en algunos casos estas cervezas están más lupulizadas.

El contenido en azúcares reductores de cada cerveza, por grupos, puede observarse en la figura 6, notándose los altos contenidos de las cervezas sin, lo que resulta lógico teniendo en cuenta los procesos de elaboración de estas cervezas. El ANOVA mostró un efecto factor tipo de cerveza, y el test LSD marcó que las cervezas rubias y las negras presentaban contenidos similares. Este hubiera sido sin duda el resultado obtenido también para los niveles de las cervezas especiales, si no fuera, de nuevo, por las cervezas de frutas, que elevan considerablemente el valor medio del grupo (tabla II).

### 3.3. CORRELACIÓN ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y FAMILIAS FENÓLICAS

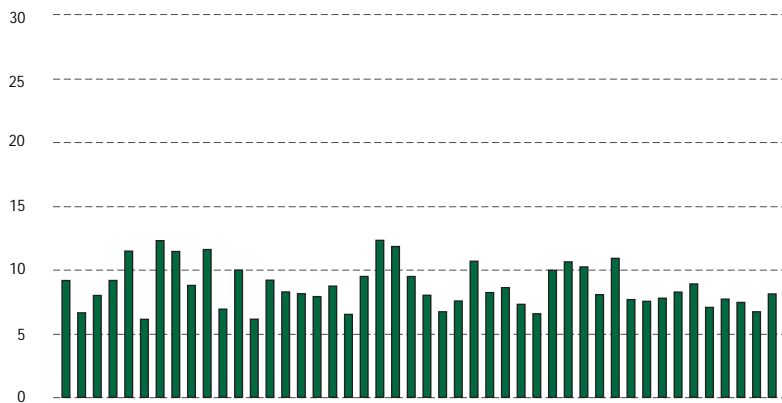
Se analizaron las posibles correlaciones lineales entre la actividad antioxidante (TEAC y CEAC) y los valores de las familias fenólicas (polifenoles totales, proantocianidinas y catequinas). Este análisis se realizó con el conjunto de las cervezas analizadas, sin separarlas por grupos con el fin de estudiar la existencia de una correlación global.

Tan sólo se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas ( $\alpha < 0,05$ ) entre la actividad antioxidante y las proantocianidinas, resultados que coincide con los de Goupy et al., (1999). Sin embargo, los coeficientes de correlación no toman valores elevados (0.4707 con TEAC y 0.5576 con CEAC), por lo que la correlación aunque significativa no puede considerarse estrecha y, por tanto, habrá que interpretar estos resultados con ciertas precauciones.

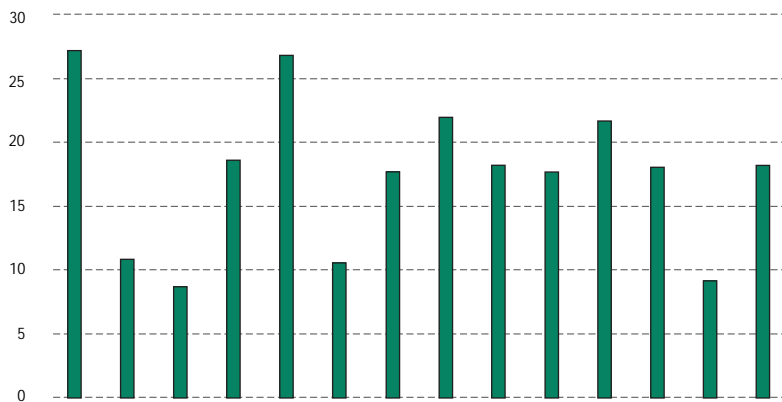
Igualmente, se evaluó si existía correlación lineal entre los parámetros TEAC y CEAC y el contenido de azúcares reductores, no encontrándose correlación significativa.

**Figura 6.** *Contenidos de azúcares reductores totales de las cervezas por grupos*

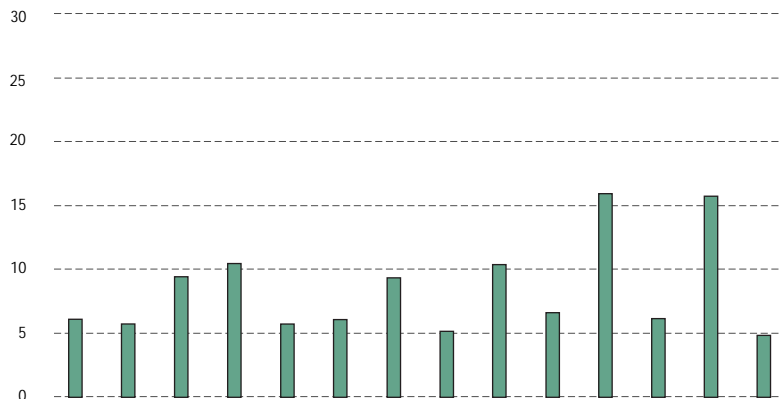
**Azúcares reductores**



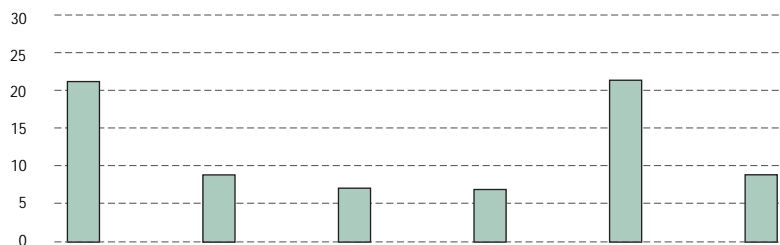
**CERVEZAS RUBIAS**



**CERVEZAS SIN**

*Azúcares reductores*

**CERVEZAS NEGRAS**



**CERVEZAS ESPECIALES**

Estos resultados parecen indicar que de los parámetros analizados eran las pro-antocianidinas las que más contribuían a la actividad antioxidante global que presentaban estas cervezas.

### 3.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE GLOBAL DE LAS FRACCIONES

Tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos, las cervezas fueron sometidas a un fraccionamiento con el fin de poder evaluar qué tipo de componentes son los más asociados a la AAO de las cervezas. Este planteamiento se hace también desde la perspectiva de que el análisis y cuantificación pormenorizada de los compuestos sobre los que se centra el presente estudio, los compuestos fenólicos, es más sencilla si éstos han sido extraídos o aislados desde la matriz de origen.

Los resultados obtenidos relativos a la AAO de las fracciones por grupos se muestran de forma resumida en las gráficas de la figura 7 a y b, donde se han representado los valores medios.

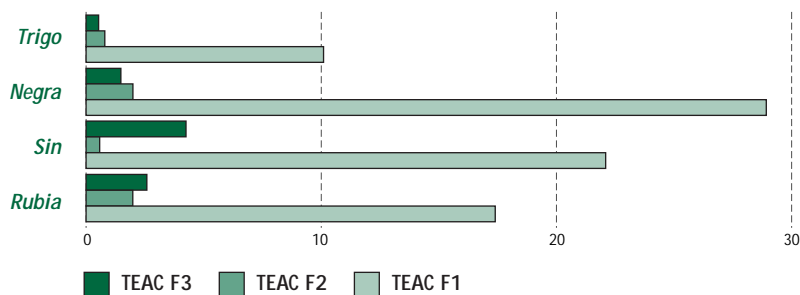
En este caso, y dado que el grupo de cervezas especiales presentaba valores muy dispares entre las muestras, se optó por desestimar este grupo.

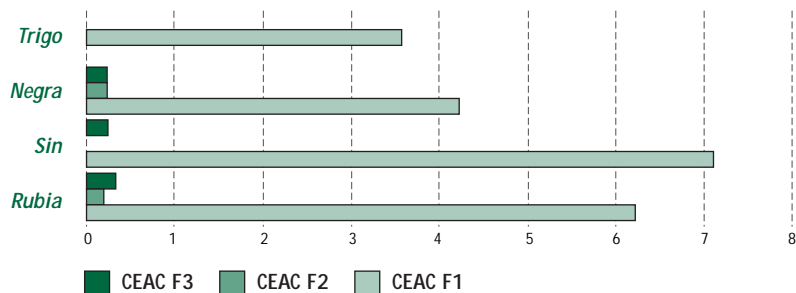
Las cervezas de frutas no fueron fraccionadas, ya que una separación correcta de sus constituyentes fenólicos hubiera implicado aplicar un protocolo distinto con el fin de separar los antocianos presentes tan sólo en ellas.

Sin embargo, para no desaprovechar datos, la cerveza ecológica se integró, por sus características, en el grupo de las cervezas rubias, y se dejaron por separado las cervezas de trigo.

En general, con dos excepciones a favor de F3, la fracción que presentó mayores valores de AAO es la fracción 1, en la que se encuentran compuestos solubles en agua, de relativo bajo peso molecular, como pueden ser ácidos, aminoácidos, azúcares, dextrinas, péptidos, vitaminas, etc. Le sigue la fracción 3, siendo la 2 la que menos AAO presenta.

**Figura 7.** Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas, expresada como TEAC (a) y como CEAC (b)





Respecto a la variabilidad intragrupo, como en el resto de los parámetros expuestos, se observaron grandes diferencias entre cervezas del mismo tipo, de tal forma que actividades similares las presentaban tanto cervezas rubias como negras o "sin". Es decir, no se puede establecer que un determinado tipo de cerveza, como ya ocurrió con la AAO de la cerveza global, presente mayor o menor actividad antioxidante en alguna de sus fracciones. De hecho el análisis de la varianza no detectó efecto factor "tipo de cerveza" y el test LSD no detectó diferencias estadísticamente significativas ni para las AAO de F1 ni de F3, y en el caso de F2 solamente detectó diferencias significativas dos a dos, de tal forma que rubias y negras eran iguales entre sí, así como trigo y sin, y distintas entre ambos grupos.

Resalta el hecho de que si se comparan las AAOs de las fracciones con las evaluadas en las cervezas de origen, éstas presentan valores notablemente inferiores, llegando a explicar en el mejor de los casos en torno al 65% de AAO de la cerveza global (figura 8).

Esto indica que una parte importante de la AAO de las cervezas está asociada a compuestos de naturaleza polimérica que quedan retenidos en la columna de separación. Resultados que están de acuerdo con datos publicados anteriormente sobre la retención de polímeros de alto peso molecular en las resinas del tipo de la usada en este trabajo (Keramat y Nursten, 1994).

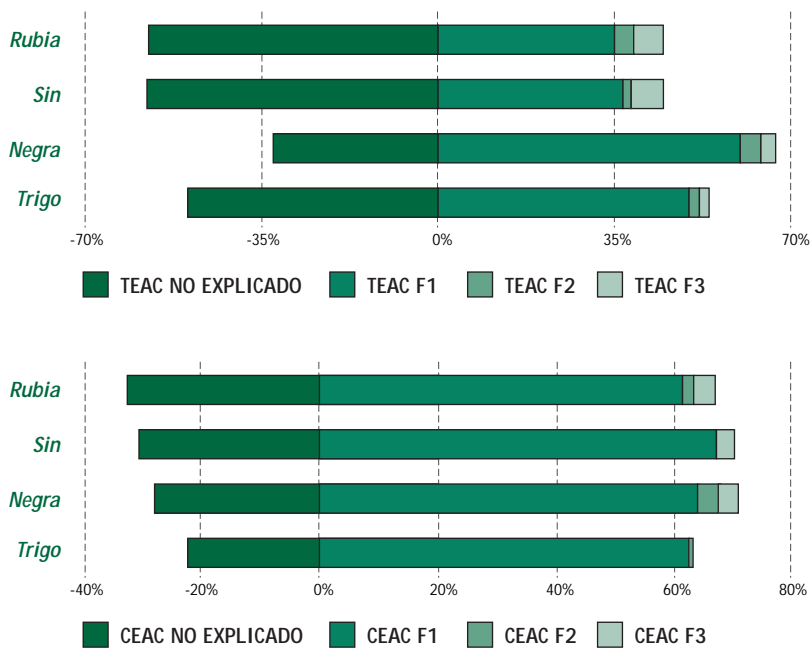
Estos polímeros pueden ser de naturaleza diversa, como fenólicos, ya sean "puros" o de interacción con proteínas o polisacáridos, algún tipo de caramelo, melanoidinas, etc. Son de color marrón más o menos oscuros dependiendo de la cerveza de la que proceden, y se observan fácilmente en la cabeza de la columna de separación.

Es interesante resaltar que se observó que en muchas de las cervezas que presentaban elevada actividad antioxidante, las fracciones aisladas sólo consiguen



explicar un porcentaje bajo de esa actividad global. Estos datos indican que, al menos en ciertos casos, los polímeros son los máximos responsables de la AAO, por lo tanto convendría prestar mayor atención y estudiar con más detenimiento estos compuestos de alto peso molecular.

**Figura 7.** Actividad antioxidante de las fracciones por grupos de cervezas y expresados en porcentajes



Estos resultados concuerdan con los comentados previamente respecto a la prácticamente ausente correlación lineal entre la AAO y la composición fenólica global.

Trabajos previos realizados por este equipo, permiten asegurar que, al contrario de lo descrito para los polímeros, la recuperación de los fenoles individualizados de relativo bajo peso molecular (hasta al menos tetrámeros) queda

garantizada en el sistema empleado, por lo que los contenidos de estos compuestos en las fracciones son directamente extrapolables a los contenidos de las cervezas de partida.

### 3.5. COMPOSICIÓN FENÓLICA PORMENORIZADA

La presencia de compuestos fenólicos individualizados en cada fracción, así como su cuantificación se llevó a cabo por HPLC-DAD. Los resultados resumidos como valores medios por grupos, con su respectivo test LSD se muestran en la tabla III.

**Tabla I.** *Contenidos medios de los fenoles indicados por grupos de cervezas*

Parámetro	TIPO DE CERVEZA			
	Rubias	Sin	Negras	Especiales
Ac. Gálico mg/L	9.14 b	9.17 b	7.71 b	3.90 a
Ac. Ferúlico mg/L	7.68 b	4.00 b	7.95 b	0.23 a
Ac. Siringico mg/L	4.69 b	7.61 b	5.13 b	1.24 a
Catequina mg/L	6.66 b	2.67 a	2.74 a	2.17 a
Epicatequina mg/L	3.23 c	1.42 b	2.73 c	0.27 a

Valores con igual letra, por filas, no presentan diferencias estadísticamente significativas para  $p = 0.05$

La composición fenólica cualitativa fue similar en todas las cervezas analizadas, aunque no así los datos cuantitativos.

La distribución de compuestos fenólicos por fracciones se describe a continuación:

- **Fracción 1:** *contienen esencialmente ácido gálico que, al no ser retenido por la resina, coeluye con todas las sustancias solubles en agua ya citadas con anterioridad. Este compuesto que se detecta muy bien, apareció en todas las cervezas y en ninguna presentó problemas de cuantificación por coeluir (en HPLC) con ningún otro compuesto que pudiera interferir su medida.*
- **Fracción 2:** *contienen esencialmente los compuestos fenólicos del grupo de bajo peso molecular, es decir, ácidos benzoicos y cinámicos y derivados de los mis-*

mos, en su caso. Se han detectado en ella los ácidos ferúlico, síringico, p-cumárico y vainillínico, y ocasionalmente el ácido p-hidroxibenzoico. De ellos, tan sólo los dos primeros aparecen de forma clara, sin interferencias, en todas las cervezas. En muchas ocasiones, los otros ácidos coeluyen con otra sustancia, no identificada hasta el momento, que dificulta notablemente su cuantificación. Por ello, se decidió que para este estudio se considerarían solamente aquellos ácidos que permiten una cuantificación segura, es decir los dos primeros mencionados.

- **Fracción 3:** contiene los derivados flavan-3ol, monómeros y oligómeros de hasta al menos cuatro unidades. Se han detectado en ella, independientemente del tipo de cerveza, siempre catequina y epicatequina, dímeros a niveles traza, algún trímero, y un pico que por su espectro puede pertenecer a esta familia. Su identificación exacta no se ha conseguido hasta el momento, y se sigue trabajando en ello. Este pico, es el mayoritario y aparece en todo tipo de cerveza.

Ya se ha comentado que se ha detectado una gran variabilidad de composición dentro de cada grupo de cervezas, la cual también se refleja en estos compuestos. Así, los rangos de variación son importantes sobre todo respecto a algunos compuestos y en algunos grupos. Por ejemplo, entre las cervezas rubias los contenidos de ácido gálico varían entre 0,8 y 32,1 mg/L. En concreto, respecto a este ácido cervezas negras y "sin" se comportan mucho más homogéneamente. Catequina y epicatequina son otros compuestos con rangos de variación muy altos, sobre todo entre las cervezas rubias, aunque en este caso también las cervezas sin y negras presentan rangos de variación amplios. Por el contrario, los contenidos de ácido síringico y ferúlico son mas homogéneos, sin que ello implique que existen algunas excepciones.

Comparando los datos cuantitativos obtenidos con algunos descritos en la bibliografía, éstos son similares, quizás algo superiores para algunos compuestos. Debe tenerse en cuenta que los datos consultados no son relativos a cervezas españolas, y que la mayoría de los trabajos no abarcan un número tan elevado de muestras como el presente estudio, en el que se recopilan datos de cervezas muy dispares entre sí, algunas de ellas con contenidos fenólicos muy elevados.

De modo similar a lo que ocurre con otros parámetros no hay una diferencia clara en la composición fenólica pormenorizada por grupos de cervezas. Tan sólo, parece que las cervezas de trigo son algo más pobres en este tipo de compuestos, sin embargo estos datos deben tomarse con precaución ya que el número de muestras analizadas de este grupo es mucho menor, por tanto quizás no estén bien re-

presentadas. De modo similar, las cervezas rubias parecen dar valores más altos de catequina y epicatequina, sin embargo esto también debe tomarse con prudencia, ya que la mayoría de las cervezas rubias tienen valores medios similares a otros tipos, lo que ocurre es que algunas de las cervezas analizadas presentan niveles realmente altos (31 mg/L de catequina o 33 mg/L de epicatequina) que elevan la media.

### 3.6. CORRELACIÓN ENTRE FENOLES PORMENORIZADA Y LA AAO

Analizada la existencia de posibles correlaciones lineales simples entre la composición fenólica pormenorizada y la AAO de la cerveza, se encontró que la suma de los contenidos de compuestos fenólicos individualizados evaluados estaba correlacionada para una probabilidad del 95% con la AAO global.

*Los resultados expuestos hasta este momento señalan que la actividad antioxidante global de las cervezas es similar a la de otras bebidas y es independiente del tipo de cerveza. Es decir, tanto en la gama de cervezas rubias, como negras, como en las sin alcohol, se encuentran cervezas con valores de AAO muy variables, y no se ha detectado que dentro de esta variabilidad predominen las cervezas de valores de actividad más altos en un grupo concreto.*

Atendiendo a los resultados expuestos y tal y como se comenta en la introducción, se decidió que la fracción que se probaría en los ensayos biológicos sería la fracción 3. Aunque esta fracción, presenta una AAO mucho menor que la fracción 1, en esta última solamente está presente el ácido gálico, por lo que su elevada AAO se debe a otros compuestos presentes que no son de naturaleza fenólica, por tanto no se consideró de relevancia para el presente estudio, aunque evidentemente sería conveniente ver su efecto sobre el metabolismo, lo que probablemente se aborde en estudios posteriores. Por otra parte, la fracción 3 concentra los fenoles de estructura flavonoidea, los cuales se han descrito, como ya se ha comentado, como compuestos con actividades fisiológicas interesantes y con efectos protectores positivos frente a distintos trastornos fisiopatológicos.

Atendiendo a que no se encontraron diferencias estadísticamente entre las AAO de los distintos grupos de cervezas, en los ensayos biológicos solamente se probaron extractos de F3 de cervezas rubias y negras, con diferencias estadísticamente significativas entre sí, tan sólo en el contenido de catequinas.

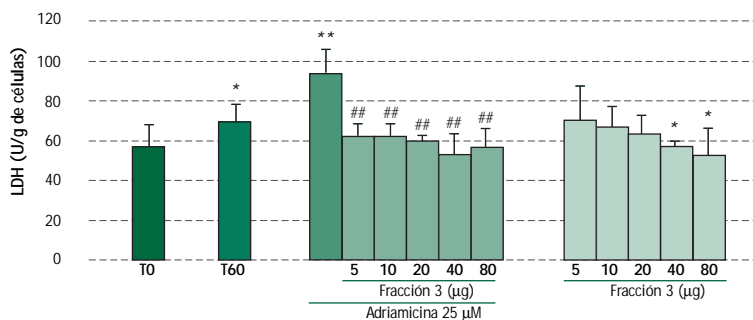
### 3.7. VIABILIDAD CELULAR: ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La LDH liberada al medio extracelular se incrementa al producirse la incubación de los hepatocitos en un medio hiperóxico ( $68 \pm 11$  U/g de células a T60 frente a  $57 \pm 12$  U/g de células a T0,  $p < 0,05$ ), lo que indica una disminución de la viabilidad celular en esta situación. Al añadir la fracción polifenólica no se observa efecto a bajas concentraciones (5 y 10  $\mu\text{g}$ ) en ambos tipos de cerveza, en cambio, sí que se produce efecto protector a partir de 20  $\mu\text{g}$  únicamente en la cerveza rubia, disminuyendo la LDH ( $57 \pm 5$  U/g de células,  $p < 0,005$ ), y a partir de 40  $\mu\text{g}$  en ambos tipos de cerveza ( $52 \pm 14$  U/g de células al añadir 80  $\mu\text{g}$  en la cerveza negra y  $55 \pm 4$  U/g de células en la cerveza rubia,  $p < 0,005$ ).

Al añadir al medio de incubación Adriamicina, disminuye de forma importante la viabilidad celular, como se demuestra al incrementarse la LDH extracelular (93 U/g de células,  $p < 0,005$ ). Este efecto se ve contrarrestado por la fracción 3 de ambos tipos de cerveza ya desde concentraciones pequeñas  $p < 0,005$  (figuras 8 y 9), en las que se puede observar como, efectivamente, cuando en el medio de incubación están presentes los extractos de cerveza, tanto negra como rubia, los valores obtenidos son igual o inferiores al control T60. Resultados que ponen de manifiesto el papel protector que ejercen dichos extractos.

**Figura 8.** Determinación de la actividad lactato hidrogenasa (LDH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extracto de cerveza negra.

#### Cerveza Negra



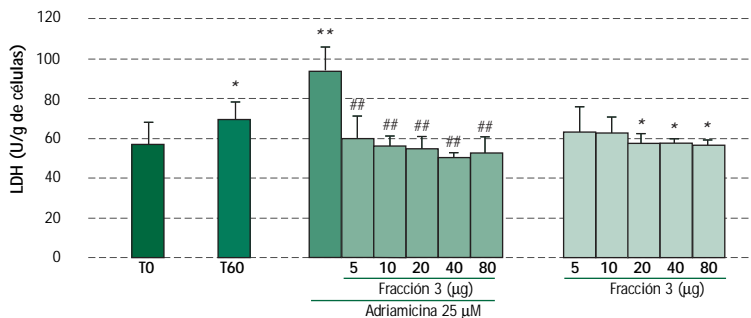
Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

\*\*  $P < 0,005$  y \*  $P < 0,05$  - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25  $\mu\text{M}$  y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

##  $P < 0,005$  y #  $P < 0,5$  - Comparando ADR 25  $\mu\text{M}$  respecto a ADR 25  $\mu\text{M}$  + diferentes concentraciones de F3.

**Figura 9.** Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.

### Cerveza Rubia



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

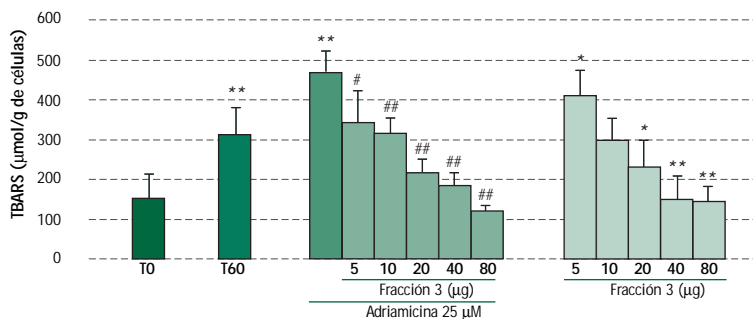
## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25 µM respecto a ADR 25 µM + diferentes concentraciones de F3.

## 3.8. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA: SUSTANCIAS QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

La incubación de los hepatocitos en presencia de  $O_2/CO_2$ , (95/5, v/v), provocó un incremento en la peroxidación lipídica, como lo demuestra el aumento de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), de  $157,16 \pm 59,06$  a  $312,27 \pm 73,63$   $\mu\text{mol/g}$  de células, con una significación de  $p < 0,005$  (figuras 10 y 11). Al adicionar la fracción 3 de la cerveza, tanto rubia como negra, no se encuentra un efecto protector a concentraciones bajas (5 y 10  $\mu\text{g}$ ). Sin embargo, a la concentración de 20  $\mu\text{g}$ , ya se produce una protección significativa, disminuyendo la cantidad de TBARS con respecto a la incubación sin adicionar ( $232,68 \pm 68,66$  en la cerveza negra y  $226,69 \pm 31,68$  en la cerveza rubia  $p < 0,05$ ), situación que se ve aún más favorecida cuando se incrementa el extracto a 40 u 80  $\mu\text{g}$  en ambos tipos de cerveza ( $148,12 \pm 60,83$  y  $134,35 \pm 45,18$  nmol/g de células, en la cerveza negra y  $143,79 \pm 5,46$  y  $157,41 \pm 45,98$  nmol/g de células, en la cerveza rubia respectivamente,  $p < 0,005$ ).

**Figura 10.** Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

### Cerveza Negra



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t-Student.

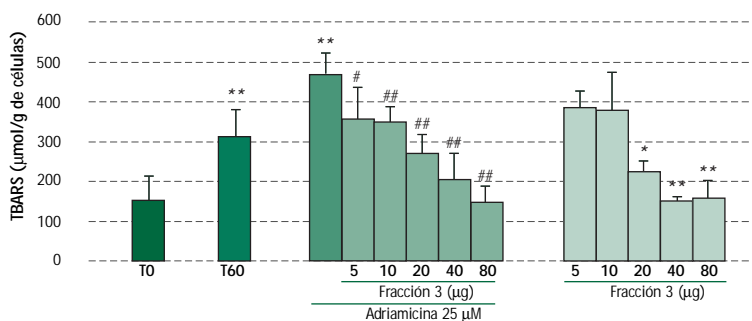
\*\*  $P < 0,005$  y \*  $P < 0,05$  - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25  $\mu$ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

##  $P < 0,005$  y #  $P < 0,5$  - Comparando ADR 25  $\mu$ M respecto a ADR 25  $\mu$ M + diferentes concentraciones de F3.

Al añadir Adriamicina, antibiótico de gran poder oxidante, se produce un aumento de la peroxidación lipídica ( $463,7 \pm 60,44$   $\mu$ mol/g de células,  $p < 0,005$ ) en los hepatocitos incubados. Este estrés oxidativo se ve contrarrestado por la adición de la fracción polifenólica de la cerveza, ya evidente desde concentraciones pequeñas (5  $\mu$ g) en ambos tipos de cerveza ( $356,67 \pm 70,14$  mmol/g de células en la cerveza negra, y  $343,35 \pm 94,73$   $\mu$ mol/g de células en la cerveza rubia,  $p < 0,05$ ), pero que alcanza mayor significación a medida que se eleva la concentración de la fracción polifenólica añadida (80  $\mu$ g) ( $124,15 \pm 13,52$  en la cerveza negra y  $142,94 \pm 34,43$  en la cerveza rubia,  $p < 0,005$ ).

**Figura 11.** Determinación de los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.

### Cerveza Rubia



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25  $\mu$ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25  $\mu$ M respecto a ADR 25  $\mu$ M + diferentes concentraciones de F3.

La disminución de los TBARS es dosis dependiente en ambos tipos de cerveza, lo que indica que a medida que aumenta la concentración del extracto en el medio de incubación los niveles de TBARS son inferiores, alcanzando incluso valores igual a T0 (células que no han sido incubadas). Por tanto, se puede afirmar que los compuestos presentes en dichos extractos están ejerciendo un efecto protector ante el daño inducido por la adriamicina.

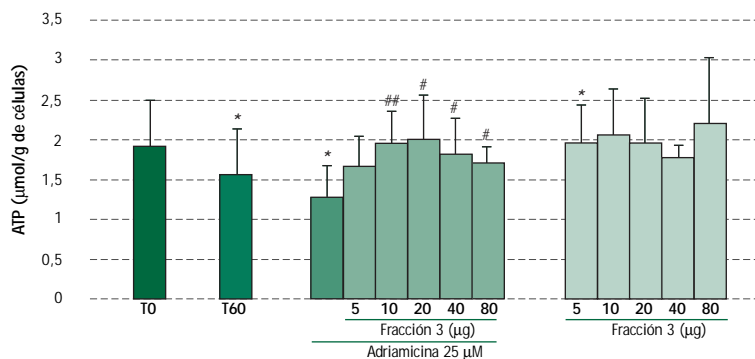
### 3.9. NIVELES DE ADENOSIN TRIFOSFATO (ATP)

La formación de ATP producido en la cadena respiratoria celular disminuye tras la incubación y, todavía más tras la adición de adriamicina ( $1,89 \pm 0,61$   $\mu$ mol/g de células en T0,  $1,56 \pm 0,59$   $\mu$ mol/g de células a T60 de incubación, y  $1,24 \pm 0,45$  tras añadir 25  $\mu$ M de Adriamicina,  $p < 0,05$ ) (figuras 12 y 13).



**Figura 12.** Determinación del adenosin trifosfato (ATP) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

### Cerveza Negra



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

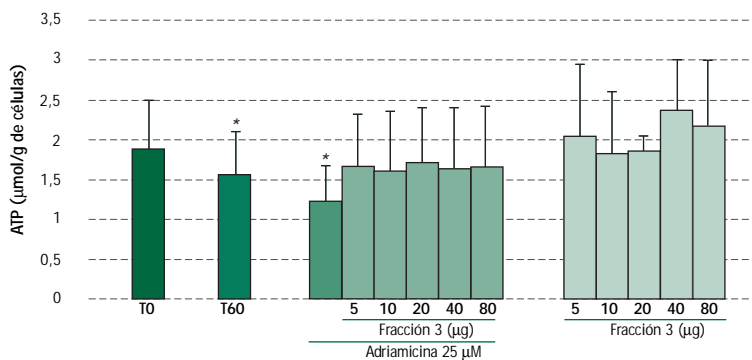
\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25  $\mu$ M y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25  $\mu$ M respecto a ADR 25  $\mu$ M + diferentes concentraciones de F3.

Esta concentración de ATP se incrementa cuando en el medio de incubación está presente la fracción 3 del extracto de cerveza, si bien no de forma significativa probablemente por la gran dispersión de los resultados. Sin embargo, sí se observa una significación estadística al contrarrestar el efecto de la adriamicina por parte de la cerveza negra, ya que los extractos a partir de 10  $\mu$ g incrementan el contenido de ATP de forma significativa ( $1,96 \pm 0,35$   $\mu$ mol/g de células,  $p < 0,005$ ). Esta situación se mantiene en concentraciones superiores del extracto si bien la significancia es menor,  $p < 0,05$ , por la dispersión de los resultados.

**Figura 13.** Determinación del adenosin trifosfato (ATP) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.

### Cerveza Rubia



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t-Student.

\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

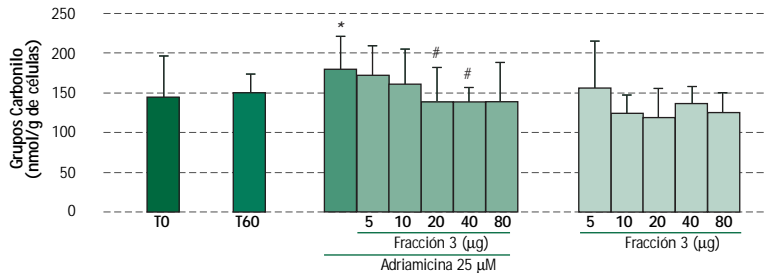
## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25 µM respecto a ADR 25 µM + diferentes concentraciones de F3.

## 3.10. DAÑO A PROTEÍNAS: GRUPOS CARBONILO

La medición de los grupos carbonilo como daño oxidativo a proteínas nos demuestra que no existe una lesión tras incubar las células hepáticas con extracto, por cuanto no se modifican los niveles. Sin embargo, al añadir adriamicina sí que se produce un incremento de los mismos, indicativo de lesión proteica ( $180,41 \pm 40,85$  nmol/g de células, frente a  $146,15 \pm 50,12$  nmol/g de células a T60) (figuras 14 y 15).

**Figura 14.** Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

### Cerveza Negra



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

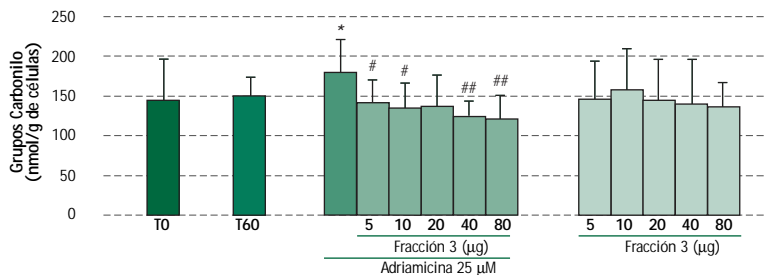
\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25 µM respecto a ADR 25 µM + diferentes concentraciones de F3.

Al adicionar los extractos de cerveza al medio donde está presente la adriamicina se puede observar un efecto protector frente a esta lesión, ya que disminuye la concentración de estos grupos carbonilo, quedando al mismo nivel prácticamente al previo a la adición de la adriamicina ( $140,78 \pm 15,01$  nmol/g de células a los 40 µg de cerveza negra, y  $125,1 \pm 18,93$ , y  $121,63 \pm 29,09$  a los 40 µg y 80 µg respectivamente de la cerveza rubia).

**Figura 15.** Determinación de los grupos carbonilo de las proteínas en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

### Cerveza Rubia



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25 µM respecto a ADR 25 µM + diferentes concentraciones de F3.

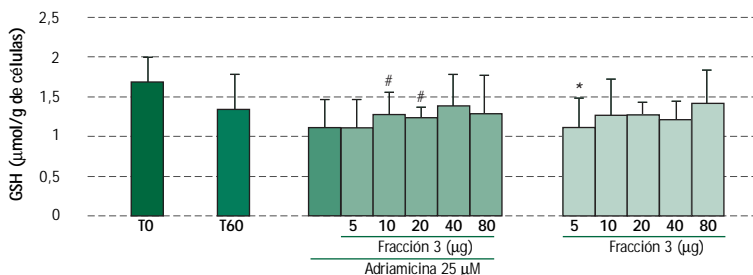
### 3.11. RESERVA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE: NIVELES DE GLUTATION REDUCIDO

La cuantificación del glutatión reducido celular nos indica la reserva de la capacidad antioxidante. Esta capacidad antioxidativa celular lógicamente se ve disminuida tras la incubación de los hepatocitos en un medio hiperóxico ( $1,39 \pm 0,37 \mu\text{mol/g}$  de células a los 60 minutos, frente a  $1,68 \pm 0,32 \mu\text{mol/g}$  de células en el momento inicial), situación que se ve aún más comprometida al añadir otro factor prooxidante, la adriamicina ( $1,12 \pm 0,35 \mu\text{mol/g}$  de células,  $p < 0,05$ ) frente a la situación basal.

Al añadir los extractos de cerveza no encontramos un factor protector, en el sentido de que no se incrementa el GSH al aportar las diferentes concentraciones de la fracción polifenólica de la cerveza rubia o negra (figuras 16 y 17). Sin embargo, la cerveza rubia, parece que tiene un cierto efecto protector frente a la capacidad oxidativa de la adriamicina, por cuanto el contenido de GSH aumenta al añadir  $10 \mu\text{g}$  ( $1,47 \pm 0,26 \text{ nmol/g}$  de células) o  $20 \mu\text{g}$  ( $1,49 \pm 0,35 \mu\text{mol/g}$  de células),  $p < 0,05$ , de la fracción 3 a los hepatocitos adicionados con adriamicina. A concentraciones superiores no se detectó significación estadística.

**Figura 16.** Determinación del nivel de glutatión (GSH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza negra.

#### Cerveza Negra



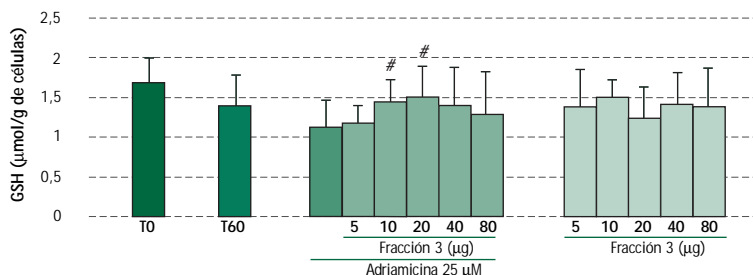
Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t' Student.

\*\*  $P < 0,005$  y \*  $P < 0,05$  - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25  $\mu\text{M}$  y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

##  $P < 0,005$  y #  $P < 0,5$  - Comparando ADR 25  $\mu\text{M}$  respecto a ADR 25  $\mu\text{M}$  + diferentes concentraciones de F3.

**Figura 17.** Determinación del nivel de glutation (GSH) en los hepatocitos aislados de rata incubados con extractos de cerveza rubia.

### Cerveza Rubia



Todas las concentraciones utilizadas son para un volumen final de incubación de 4ml. Los resultados son media  $\pm$  SD de 7 experimentos diferentes. Para el cálculo de la significancia estadística se aplicó el test de la t Student.

\*\* P < 0,005 y \* P < 0,05 - Comparando T0 respecto a T60; T60 respecto a ADR 25 µM y T60 respecto a las diferentes concentraciones de F3.

## P < 0,005 y # P < 0,5 - Comparando ADR 25 µM respecto a ADR 25 µM + diferentes concentraciones de F3.

*A modo de resumen de estos resultados, se puede decir que los extractos de cerveza utilizados (F3) aumentan la viabilidad celular (LDH), disminuyen la peroxidación lipídica (TBARS), aumentan los niveles de ATP, reducen la formación de grupos carbonilo, y finalmente aumentan o mantienen los niveles de GSH. Todos estos parámetros ponen de manifiesto el poder antioxidante que presenta la F3 y, por tanto, protector ante el estrés oxidativo inducido por el antibiótico antitumoral adriamicina. La adriamicina, como hemos dicho previamente, es un antibiótico que se utiliza en el tratamiento del cáncer, y sus efectos secundarios son debidos, en parte, a la generación de especies oxigénicas reactivas formadas en el proceso de metabolización de dicho antibiótico. Ambos tipos de cerveza presentaron efectos similares, tal y como se esperaba atendiendo a la similitud de composición fenólica de las F3 de ambos grupos de cervezas. Por tanto, los extractos de cerveza redujeron los efectos secundarios del citado antibiótico (en experimentación animal). Estos resultados apuntan hacia el hecho de que un consumo moderado de cerveza podría tener ciertos efectos positivos para la salud, ya que aportaría compuestos con actividad antioxidante protectora.*

## 4

## ■ Resumen de los resultados obtenidos:

- *La cerveza es un producto con una capacidad antioxidante global significativa, con valores similares a otras bebidas alcohólicas como los vinos, o analcohólicas como mostos, néctares o zumos.*
- *La actividad antioxidante es independiente, en principio, del tipo de cerveza. Cervezas rubias, negras y sin alcohol presentan valores similares, con mayor variabilidad intra-grupo que inter-grupo.*
- *En general, la dotación fenólica, tanto global como pormenorizada, de las cervezas es similar, aunque las cervezas negras presentaron contenidos algo mayores.*
- *Las proantocianidinas parecen ser la familia fenólica más correlacionada con la capacidad antioxidante de las cervezas.*
- *Los compuestos aislados de las cervezas, esencialmente derivados flavan-3ol, (F3) han actuado aumentando la viabilidad celular (LDH), disminuyendo la peroxidación lipídica (TBARS), aumentando los niveles de ATP, reduciendo la formación de grupos carbonilo, y finalmente aumentando o manteniendo los niveles de GSH de hepatocitos aislados de rata y sometidos a la acción de un antibiótico antitumoral. Todos estos resultados ponen de manifiesto el poder antioxidante, y por tanto protector, ante el estrés oxidativo inducido por el antibiótico antitumoral adriamicina.*
- *De nuevo, los distintos tipos de cerveza presentaron efectos similares.*
- *Queda aún por identificar la naturaleza de los polímeros de alto peso molecular que parecen ejercer un papel importante en el efecto protector global de la cerveza.*

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A., Kelly, J. And Stohs, S. J. (1994). Adriamycin- induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology*. 95: 1-9
- 2 Benzie, I. F. F. and Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- 3 Bergmeyer, H. U. and Bernt, T. (1974). Lactate dehydrogenase, assay with pyruvate and NADH. *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Bergmeyer. pp: 574-579.
- 4 Berry, M. N. and Friend, D. J. (1969). High yield preparation of isolated rat parenchimal cells. *J. Cell Biol.* 43: 506-520.
- 5 Bourne, L., Paganga, G., Baxter, D. , Hughes, P. and Rice-Evans, C. (2000). Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Radic. Res.* 32 (3): 273-80
- 6 Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T. P. M., Stes, H. (1983). Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides an its relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharm.* 32: 2529-2534.
- 7 Cao, G., Booth, S., Sadowski, J. A. and Prior, L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:1081-1087
- 8 Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radicals Biol. Med.* 22: 749-760.
- 9 Carlsen, S. A., Schmell, E., Weigel, P. H. and Roseman, S. J.(1981). The effect of isolation on the serface properties of isolated rat hepatocytes. *Biol. Chem.* 256: 8058-8062
- 10 Davis, J. Kelvin (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61:1-31
- 11 Denke, M. A. (2000). Nutritional and health benefits of beer. *Am. J. Med. Sci.* 320 (5): 320-6
- 12 Di Stefano R. y Cabrero MC. (1990). Frazionamiento dei polifenoli dei vini rossi. *L' enotecnico* 26:99-106.

- 13 Eastwood, M.A. (1999). Interaction of dietary antioxidants in vivo: Now fruit and vegetables prevent disease?. *QJM*. 92 (9): 527-30
- 14 Férté, J.,Kuhnel, J.M., Chapuis, G., Rolland, Y., Lewin, G. and Schwaller, M. A. (1999). Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 42:478-489
- 15 Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., and Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol 47, 3: 1935-1940.
- 16 Fridovich, I. (1976). *Free radicals in Biology*, Pryor, W. A., ed. Academic Pres. Vol.1
- 17 Gingliano, D. (2000). Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 10 (1): 38-44
- 18 Goodman, J., Hochstein, P. (1997). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox-cycling of doxorubicin and daunomicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 797- 803
- 19 Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev.Nutr.* 16:33-50
- 20 Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M. And Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 349:699
- 21 Hollman, P.,Tijburg, L. and Yang, C. (1997). Bioavailability of flavonoids from tea. *Critical Reviews Food Sci. Nutr.* 37 (8): 719-738
- 22 Ishige, K., Schubert, D., and Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.* 30 (4): 433-446
- 23 Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H. and Koshino, S. (1995). Reducing activity and flavor stability of beer. *Master Brew. Assoc. Am., Tech. Q.* 32: 90-94.
- 24 Kanner, J. and German, J. B. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev Food Sci Nutr.* 25: 317-364.



- 25 Keremat J. y Nursten HE. (1994). The relationship between the coloured compounds present in the pressed liquor of cane sugar and those formed in Maillard reactions. *Food Chemistry*, 51:417-420.
- 26 Krebs, H. A., Cornell, N. W., Lund, P. and Hems, R. (1974). Regulation of hepatic metabolism. Lundquist, F. Tygsup N. eds. Munksgaard, Copenhagen.
- 27 Krebs, H. A., Lund, P. and Edwards, H. (1979). Cell populations. Methodological surveys (B). *Biochemistry*. Chichester, West Sussex, England. Publisher. Vol 9, pp: 1-6
- 28 Lamprecht, W. and Trautschold, I. (1974). Adenosin triphosphate (ATP), determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer. ed. pp: 2101-2110.
- 29 Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, b. W., Shaltiel, S. And Stadtman, e. R. (1990). *Methods in Enzymology*. Vol. 186. "Oxygen radicals in biological systems. Part B: Oxygen radicals and antioxidants. Ed. L. Packer and A. Glazer, Academic, Press, Inc. London.pp:466-478
- 30 Mc Murrough I, Roche G.P. y Cleary K.G. (1984). Phenolics in beers and worts. *J. Inst. Brew*. 90:181.
- 31 Miranda, C.L., Stevens, J. F., Ivanov, V. McCall, M. Frei, B., Veinzer, M. L. and Buhler, D. R. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and non-prenylated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 3876-3884
- 32 Moll, M., Fonknechten, G., Carnielo, M. and Flayeux, R. (1984). *Master Brew. Assoc. Am., Tech. Q.* 21: 79.
- 33 Mottilla, M.J., Breto, M., Dalmau, J. (1995). Vitaminas de la dieta en la prevención de la arterioesclerosis: acción antioxidante del beta-caroteno y de las vitaminas E y C. *Acta Pediátrica Española*, 53 (2): 77-84
- 34 Muñoz, P., Sáez, G. and Valls, V. (2000). Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. En: *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados*. Ed. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.pp: 63- 70.

- 35 Noel, S., Liégeois, C., Lermusieau, G., Bodart, E., Badot, C. and Collin, S. (1999). Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized in the boiling kettle. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4323-4326.
- 36 Parker, L. (1994). Vitamin E is natura's master antioxidant. *Scient. Am. Science Med.* (march/april): 54-63
- 37 Paronetto, L. (1977). *Polifenoli e Tecnica enologica*. Selepress. Milan
- 38 Pérez-Magariño, S., Revilla, I., González-San José, M. L. and Beltrán, S. (1999). Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *J. Chromatogr A.* 847: 75-81.
- 39 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* 26 (9110): 1231-1237.
- 40 Rice-Evans, C. (1995). Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes: In: *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*. Rice-Evans, C. and Bruckdorfer, K. R. Eds. Portland Press, London W1N.JA. U. K. Pp:1-32
- 41 Riemersma, R. A., Rice-Evans, C., Tyrrell, R. M., Clifford, M. N. and Lean, M. E. (2001). Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM.* 94 (5): 277-282
- 42 Rodríguez, R. J., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. (2001). Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 39 (5): 437-445
- 43 Romero, F. J. and Viña, J. (1983). *Practical Biochemistry for colleges*. Edited by E. J. Wood pp:111-113.
- 44 Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130 (Suppl. 8S): 2073S-2085S
- 45 Scott, G. (1997). *Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition*. Scott, G. ed. Albion Publishing Chichester, West Sussex, PO20 6QL England. Pp: 1-334

- 46 Seglen, P. O. (1972). Preparation of rat liver cells. Effect of calcio on enzymatic dispersion of isolated perfused liver. *Exptl. C. Res.* 74: 450-454
- 47 Singal, P. K., Iliskovic, N. Li, T. And Kumar, D. (1997). Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB. J.* 11: 931-936
- 48 Stacey, N. and Priestly, B. G. (1978). Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: relationship to toxicity of CCl<sub>4</sub>, ADP/ Fe +3, and diethyl maleate. *Tox. Appl. Pharmacol.* 45: 41- 48
- 49 Stahl, W., and Sies, H. (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes.* 46 (Suppl. 2): S14-S18
- 50 Turston, P. A. and Tubb, R. S. (1981). Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavors: a simple method for determining phenols in wort and beer. *J. Inst. Brew.* 87: 177.
- 51 Ueda, T., Ueda, T. and Armstrong, D. (1996). Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res.* 28 (3): 184-192
- 52 Valls, V., Castelluccio, C., Fato, R., Genova, M. L., Bovina, C., Saéz, G., Marchetti, M., Parenti-castelli, G. and Lenaz, G. (1994). Protective effect of exogenous coenzyme q against damage by adriamycin in perfused rat liver. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 33 (4): 633-642
- 53 Wayner, D. D. M., Burton, G. W. and Ingold, K. (1985). Quantitative measure of the total, peroxy radical-trapping capacity of human blood plasmas by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* 187, 33-37.
- 54 Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdottier, J., Danesfvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandstrom, B. and Dragsted, L. O. (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 87-94

