



Treball Final de Grau

Characterization of beers by liquid chromatography and chemometric data analysis

Caracterització de cerveses mitjançant cromatografia de líquids i tractament quimiomètric de les dades

Clara Pérez Ràfols

June 2014

Aquesta obra esta subjecta a la llicència de:
Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/>

*Live as if you were to die tomorrow,
learn as if you were to live forever.*

Gandhi

En primer lloc vull agrair al meu tutor, el Dr. Xavier Saurina, tot el temps que m'ha dedicat i tot el que m'ha ensenyat durant aquests quatre mesos i també per estar disponible sempre que l'he anat a buscar.

Vull agrair també al David per totes les hores que hem passat al laboratori, per tot el temps que hem treballat junts i pels molts pics integrats.

Finalment, agrair també a tots els familiars i amics que han estat al meu costat durant aquests quatre anys.

REPORT

CONTENTS

1. SUMMARY	3
2. RESUM	5
3. INTRODUCTION	7
3.1. Phenolic compounds	7
3.1.1. Analysis	8
3.2. Beer	11
3.2.1. Beer composition	11
3.2.2. Beer styles	13
3.3. Chemometrics	15
3.3.1. Principal component analysis	15
3.3.2. Partial least squares-discriminant analysis	16
3.3.3. Pre-treatment of data	17
4. OBJECTIVES	19
5. EXPERIMENTAL	21
5.1. Reactius, Patrons i dissolvents	21
5.1.1. Preparació dels patrons polifenòlics	22
5.1.2. Mostres	23
5.2. Instrumentació	23
5.2.1. Instruments i aparells	23
5.2.2. Condicions cromatogràfiques	23
6. TRACTAMENT DE DADES	25
6.1. Sincronització dels cromatogrames	25
6.2. Càlcul de l'àrea	27
7. RESULTATS I DISCUSSIÓ	29
7.1. Identificació i quantificació dels compostos polifenòlics	29
7.2. Estudi de la degradació de les mostres al llarg del temps	32
7.3. Estudi de l'efecte de matriu	34
7.4. Estudi de la influència de l'envàs	35
7.5. Anàlisi de components principals	36

7.5.1. Cromatogrames	37
7.5.2. Àrees	39
7.5.3. Concentracions	40
7.6. Anàlisi discriminant per mínims quadrats parcials	41
7.6.1. Diferenciació entre cerveses ales i lagers	41
7.6.2. Diferenciació entre cerveses txeques i espanyoles	43
10. CONCLUSIONS	45
11. REFERENCES AND NOTES	47
12. ACRONYMS	49
APPENDICES	51
Appendix 1: List of beer samples	53

1. SUMMARY

Polyphenols are a group of substances commonly found in food and drinks which not only are responsible for organoleptic properties and have beneficial effects in health but also can be used to discriminate among samples from different regions and styles.

In this project 63 beers from different styles and countries have been characterized based on their polyphenolic profile, which has been obtained by high performance liquid chromatography with UV detection at different wavelengths (280, 310, 370, 420 and 520 nm). A total of 13 polyphenols have been quantified.

Preliminary studies have shown that neither the container nor the batch affects the polyphenolic profile and that degradation of polyphenols is not noticeable for a period of two weeks. Matrix effect was not observed. Hence, quantification has been carried out by external calibration curve.

Three different approaches (chromatograms, areas and concentrations) have been used to build principal component analysis (PCA) models in order to discriminate between ale and lager beers but only the concentrations approach has been capable of successfully discriminate between both types of beer. Afterwards, the 13 polyphenols concentrations have been used to build a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) model which has allowed to discriminate beers according to their type and correctly assign new samples.

Finally, a PLS-DA model has also been built in order to discriminate lager beers according to its country of origin (Spain and Czech Republic).

Keywords: Polyphenols, beer, PCA, PLS-DA, HPLC

2. RESUM

Els polifenols són un conjunt de substàncies que es troben en aliments i begudes. A més de ser responsables d'algunes propietats organolèptiques i presentar propietats beneficioses per a la salut, els polifenols també poden ser utilitzats per diferenciar entre mostres de diferents estils i procedències.

En aquest treball s'han caracteritzat 63 cerveses de diferents estils i països basant-se en el seu perfil polifenòlic, obtingut mitjançant cromatografia de líquids d'alta resolució amb detecció per absorptió a diverses longituds d'ona (280, 310, 370, 420 i 520 nm). En total s'han quantificat 13 polifenols.

En estudis preliminars s'ha vist que l'envàs i el lot de la cervesa no afecten al seu perfil polifenòlic i que durant un mínim de dues setmanes no s'observa degradació. S'ha comprovat també que la cervesa no presenta efecte de matriu i, per tant, la quantificació s'ha realitzat mitjançant recta de calibratge externa.

Per tal de discriminar entre les cerveses d'alta i baixa fermentació (*ale* i *lager*) s'han construït models d'anàlisi de components principals (PCA) a partir de tres enfocaments diferents (cromatogrames, àrees i concentracions) però només el model construït a partir de les concentracions ha sigut capaç de diferenciar satisfactòriament entre els dos tipus de cervesa. Posteriorment s'ha construït també un model d'anàlisi discriminant per mínims quadrats parcials (PLS-DA) a partir de les concentracions que ha permès diferenciar les mostres en funció del tipus de fermentació i assignar correctament noves mostres.

Finalment, s'ha construït també un model de PLS-DA per tal de discriminar entre les cerveses *lager* en funció del seu país d'origen (Espanya i la República Txeca).

Paraules clau: Polifenols, cervesa, PCA, PLS-DA, HPLC.

3. INTRODUCTION

3.1. PHENOLIC COMPOUNDS

Phenols are the most abundant and widely represented class of plant natural products, many of them being only found in particular families, species or organisms. Together with isoprenoids, sulphur-containing compounds and nitrogen-containing compounds, polyphenols are the main secondary metabolites in plants, which are nonessential for the basic metabolic processes of growth and development of the plant but crucial for many important functional aspects of plant life. Amongst other functions, polyphenols play an important role in defence; either from herbivores, microbial infection and UV radiation; and signalling properties of the plant [1–3].

Phenolic compounds have attracted the attention of researchers for decades. Traditionally, interest in polyphenols has mainly been related to their organoleptical properties such as colour, astringency, bitterness and taste as well as to their physiological importance to plants. However, more recently this interest has been focused in their nutritional value [1].

Polyphenols are present not only in fruits and vegetables but also in cereal crops. They are not essential for short-term wellbeing but there is increasing evidence that modest long-term intakes of polyphenols can have favourable effects on the incidence of cancers and chronic diseases, including cardiovascular disease, type II diabetes and impaired cognitive function [2].

Phenolic compounds have been reported to act as antitumor, anti-mutagenic and anti-carcinogenic agents but they are best known due to their antioxidant activity. They may function as reducing agents, free radical scavengers, hydrogen donors, singlet oxygen quenchers and potential complexers of prooxidants [1–8].

Phenolic compounds are characterized by having at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups. Depending on the number of rings and the structural elements that bind these rings, polyphenols can be divided into several groups:

- Flavonoids are polyphenolic compounds with two aromatic rings connected by a three-carbon bridge, commonly cyclized with oxygen. Differences in the number and

substitution pattern of the heterocyclic ring result in the major flavonoid classes: flavones, flavanols, flavan-3-ols, isoflavones, flavanones and anthocyanidins [1–3,7–9].

- Phenolic acids are non-flavonoids polyphenolic compounds that can be divided into two subgroups, hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, based on C6-C1 and C6-C3 backbones [1–3,7,10].
- Stilbenes are polyphenolic compounds displaying two aromatic rings linked by an ethane ring [3].
- Tannins are water-soluble polyphenolic compounds with molecular weight ranging from 500 to 4000. They can be classified into hydrolysable tannins and condensed tannins [3].
- Lignans are formed from two phenylpropane units [10].

Table 1 shows the classification of polyphenols and the list of compounds studied in this report. Figures 1 to 4 show their structures.

3.1.1. Analysis

The most widely used technique for analysis of polyphenols is high-performance liquid chromatography (HPLC), which combines the advantages of simultaneous separation and quantification without the need for preliminary derivatization [7–9,11,12]. Separations are followed mainly on C₈ and C₁₈ reverse-phase columns and elution systems are usually binary, with an aqueous acidified polar solvent and a less polar organic solvent such as methanol or acetonitrile [9,11,12]. Detection has been based, most commonly, on UV-vis absorption using diode array detection (DAD). Phenols have two characteristic absorption bands in the 240-285 and 300-550 nm range. Less frequently, it has also been used electrochemical and fluorescence detection [8,9,11,12].

Identification can be made comparing the retention times and the UV-vis spectrum of a particular compound with the standard using a diode array detector. However, the exact identification of phenolic compounds requires mass spectrometry (MS). In recent years, HPLC-DAD-MS methods have also been reported [7,9,12].

Other less extended analytical methods for the analysis of polyphenols are gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE). GC usually requires preliminary derivatization due to the limited volatility of many polyphenols [7,9,12].

Table 1. Classification of polyphenols studied in this report.

Polyphenols		
Class	Subclass	Compounds studied
Flavonoids	Flavones	-
	Flavonols	Rutin
		Quercetin
	Flavan-3-ols	(+)-Catechin
		(-)-Epicatechin
	Isoflavones	-
	Flavanones	-
Anthocyanidins	-	
Phenolic acids	Hydroxybenzoic acids	Gallic acid
		Protocatechuic acid
		Gentisic acid
		Vanillic acid
		Syringic acid
		Salicylic acid
	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid
	p-Coumaric acid	
	Ferullic acid	
Stilbenes	-	-
Tannins	-	-
Lignans	-	-

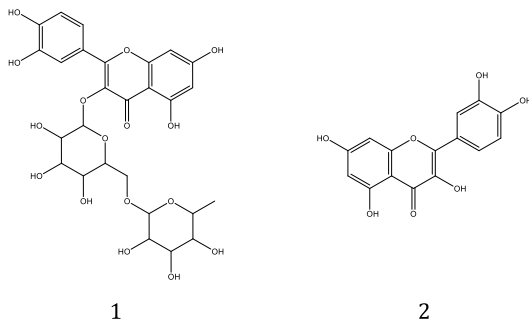


Figure 1. Chemical structures of flavones: rutin (1) and quercetin (2)

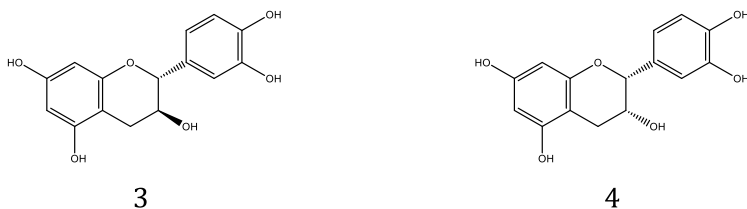


Figure 2. Chemical structures of flavanols: (+)-catechin (3) and (-)-epicatechin (4)

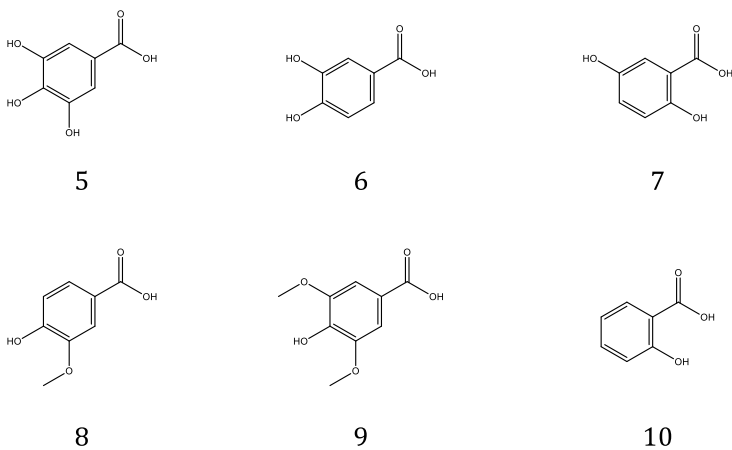


Figure 3. Chemical structures of hydroxybenzoic acids: gallic acid (5), protocatechuic acid (6), gentisic acid (7), vanillic acid (8), syringic acid (9) and salicylic acid (10)

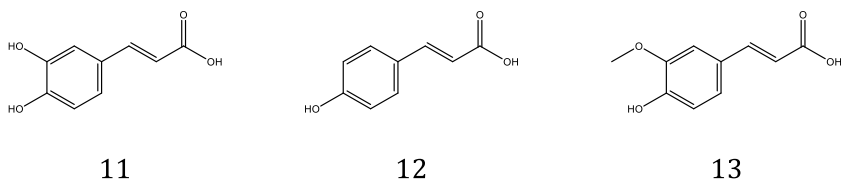


Figure 4. Chemical structures of hydroxycinnamic acids: caffeic acid (11), p-coumaric acid (12), and ferullic acid (13)

3.2. BEER

3.2.1. Beer composition

Beer is the oldest and most produced alcoholic beverage worldwide and is made from only four ingredients: water, malt, hops and yeast [13–16].

Beer is a very complex beverage that contains a wide range of chemical species in relatively small quantities that determine the properties of beer in terms of appearance and flavour. Most chemical compounds in beer are either present in the raw materials or they are by-products of yeast metabolism during the fermentation [14,16]. Table 2 shows the main constituents of beer.

Water is the major individual component in beer, usually representing more than 90% of it. This fact makes water composition very important; any water that will end up in the bottle of beer must be of the highest chemical and microbiological quality [13–16].

The majority of brewers use barley malt although wheat, rye, maize, oats, triticale, rice, sorghum and millet can also be used [13,15,16]. The degree of heating that barley malt receives has profound effects on the character of beer that can be brewed. The entire colour in beer comes from malt. Lightly-roasted barley will produce a very pale beer while deeply-roasted, charred or smoked malts will produce dark or black beers [15].

Barley malt and adjuncts (substances which provide fermentable carbohydrates in addition to those from malt) are the sources of nitrogenous compounds, lipids, carbohydrates and vitamins. Adjuncts are used to replace malt not only for economic reasons but also to modify the flavour [16].

Hops are not an essential ingredient to beer but they provide bitterness and characteristic hoppy flavours; without them beer would be sickly-sweet and dull. In addition, hops provide some protection against bacterial spoilage and they are fundamental for good foam formation [15,16].

Over the centuries some alternatives to hops such as heather flowers, bog myrtle, cloves, citrus fruits and spruce tips have also been used. However, since the 15th century hops have crowded out all other competitors, being the female hop cone the preferred one [13,15].

Table 2. Main constituents of beer [16,17].

Substances	Concentration	Number of compounds	Source or agent
Water	90-94 %	1	-
Ethanol	3-5 % v/v	1	Yeast, malt
Carbohydrates	1-6 % w/v	~100	Malt
Carbon dioxide	3.5-4.5 g/L	1	Yeast, malt
Inorganic salts	500-4000 mg/L	~25	Water, malt
Total nitrogen content	300-1000 mg/L	~100	Yeast, malt
Polyphenols	80-500 mg/L	>20	Malt, hops
Organic acids	50-250 mg/L	~200	Yeast, malt
Higher alcohols	100-300 mg/L	80	Yeast, malt
Aldehydes	30-40 mg/L	~50	Yeast, hops
Esters	25-40 mg/L	~150	Yeast, malt, hops
Sulphur compounds	1-10 mg/L	~40	Yeast, malt, hops
Hop derivates	20-60 mg/L	>100	Hops
Vitamin B compounds	5-10 mg/L	13	Yeast, malt

Yeast was the last ingredient to be discovered because it is a single-celled organism invisible to the naked eye. However, yeast is a very important ingredient because it is responsible for the fermentation process. When added to a sugar-rich solution it starts to metabolize the sugar, releasing alcohol and carbon dioxide in the process [15,16].

Apart from alcohol and carbon dioxide, yeast also produces other compounds like higher alcohols, organic acids, esters, aldehydes, ketones or sulphur compounds, which play a key

role on the sensorial profile of beer. This leads brewers to be very protective of their yeast [13,16].

3.2.2. Beer styles

Many thousands of different beer brands are produced all over the world and most of them can be classified into defined beer styles which have been developed over the centuries in different regions. According to the fermentation process, a first classification can be made into top and bottom fermented beer [18].

Until the sixteenth century ale (top fermentation) was the main type of beer in Europe but nowadays it only represents a small percentage of the total beer consumption. Top fermented beers are very common in Britain, Germany, Canada's eastern regions, the United States and Belgium [18,19].

Beers in the ale family are produced at warm temperature (typically between 16 °C and 24 °C). At these temperatures, yeast produces significant amounts of esters and other secondary flavour and aroma products. Therefore, fruity, spicy or earthy flavours are not unusual. Ales are ready to drink in days rather than weeks [15,18].

The development of the present bottom fermentation beer styles did not occur until the end of the nineteenth century. However, nowadays lager (bottom fermentation) represent more than 90% of the beer produced worldwide and is the dominant style in almost every country [18,19].

Beers in the lager family undergo primary fermentation at 8-15 °C followed by a secondary fermentation between -1 °C and +4 °C. Lagers are ready to drink in 1-3 weeks [19].

Both ale and lager come in a full range of colours, strengths and characters, making it possible to divide each type into different styles. Table 3 shows some of the principle beer styles classified into ale and lager.

There are also some beer styles defined with different criteria. As an example trappist beers are characterised by being brewed in trappist monasteries, either by the monks themselves or under their supervision. Similar beers produced by non-trappist monasteries, produced by a commercial brewery under an arrangement with an extant monastery, branded with a name of a defunct or fictitious abbey by a commercial brewer or given a vaguely monastic branding are called abbey beers [20].

Table 3. Some of the principal beer styles [18,19].

Styles of beer	Origin	Characteristics	Typical range of alcohol [%v/v]
Top fermentation			
Standard/ordinary bitter	Britain	Low gravity, low alcohol levels	3.2–3.8
English pale ale	Britain	Dry hop, bitter, estery, malty, low carbonation	4.6–6.2
Mild	Britain	Refreshing, yet flavorful	2.8–4.2
Brown porter	Britain	English dark ale with restrained roasty characteristics	4.0–5.4
Robust porter	Britain	Malty dark ale	4.8–6.0
Dry stout	Ireland	Dark, roasty, bitter, creamy ale	4.0–5.0
Sweet stout	Britain	Dark, sweet, full-bodied, slightly roasty ale	4.0–6.0
Kölsch	Germany	Smooth and crisp	4.4–5.2
Lambic	Belgium	Fermented by a variety of Belgian microbiota	5.0–7.0
Rauchbier	Germany	Smoky aroma and flavor and a somewhat dark color	4.8–6.0
Weizen/Weissbier	Germany	Pale, spicy, fruity, refreshing wheat-based ale	4.3–5.6
Weizenbock	Germany	Strong, malty, fruity, wheat-based ale	6.5–8.0
Bottom fermentation			
German Pilsner	Germany	Crisp, clean, refreshing beer	4.4–5.2
Bohemian Pilsner	Czech Republic	Crisp, complex and well-rounded yet refreshing	4.2–5.4
Classic American Pilsner	United States	Rice contributes a crisper, more neutral character	4.5–6.0
Vienna lager	Austria	Soft, elegant maltiness	4.5–5.7
Oktoberfest/Märzen	Germany	Depth of malt character	4.8–5.7
Dark American lager	United States	Sweeter version of standard lager	4.2–6.0
Munich Dunkel	Germany	Depth and complexity	4.5–5.6
Schwarzbier	Germany	Probably a variant of the Munich Dunkel style	4.4–5.4
Maibock/Helles bock	Germany	Pale, strong, malty lager beer	6.3–7.4
Traditional bock	Germany	Dark, strong, malty lager beer	6.3–7.2
Doppelbock	Germany	Strong and rich lager	7–10+
Eisbock	Germany	An extremely strong, full and malty dark lager	9–14+

In Spain the most common type of beer is pale lager and their classification is usually referred to bailing degree. The bailing degree (E.S.P. in Spanish) is the group of organic ingredients that make up the wort before fermentation, except for water, and its quantity is expressed in grams of “ESP” for each 100 grams of wort. In non-alcoholic beers bailing degree varies between 2 and 4. In traditional beers, special beers and extra special beers bailing degree is not less than 11, 13 and 15 respectively [21].

3.3. CHEMOMETRICS

Chemometrics is a chemical discipline that uses mathematics, statistics and formal logic to design or select optimal experimental procedures; to provide maximum relevant chemical information by analysing chemical data and to obtain knowledge about chemical systems [22].

Chemometrics is a relatively new discipline; Chemometrics Society was founded in 1974 and the first two specialized chemometrics journals (*Journal of Chemometrics* (Wiley) and *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Elsevier)) were launched in 1986. However, chemometrics was not introduced to industry and academy until the 1990s [22].

The development of this new discipline was forced by a growing mass of data and the increase of its complexity due to the appearance of new instruments. In addition, relationships and models being studied are increasingly complex and multivariate data, with multiple variables measured on multiple samples or at multiple time points, is required to describe these systems. However, the development of chemometrics had to wait until the computers were powerful enough to process big amounts of data [22,23].

3.3.1. Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) is a chemometric method that allows us to visualize enormous amounts of data in a low-dimension plane, usually consisting in 2 to 5 dimensions. This overview may reveal groups of observations, trends and outliers as well as relationships between observations and variables, and amongst the variables themselves [22,23].

PCA reduces the number of variables by making linear combinations of the original variables. These linear combinations are called principal components. The first principal component (PC1) explains the largest possible variation in the data while PC2, orthogonal to PC1, represents the direction of the largest residual variation around PC1 (figure 5). PC2 is chosen orthogonal to PC1 in order to make sure that it does not repeat information already

contained in PC1. PC3 is orthogonal to the first two and represents the direction of highest residual variation around the plane formed by PC1 and PC2. Further principal components can be extracted but they will contain less and less variance and therefore less information [22].

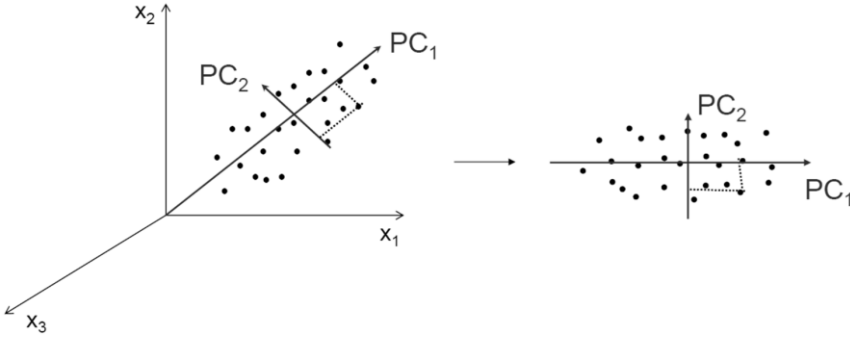


Figure 5. Representation of PC1 and PC2

The projection of the original data and the original variables on the principal component space are called scores and loadings respectively. The score plot shows the relationship amongst objects and the presence of outliers while the loading plot shows the importance of the original variables and the correlation amongst them [22].

PCA decomposes the original data matrix (X) into its principal components as follows

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

(n,m) (n,npc) (npc,m) (n,m)

where T is the scores matrix, P is the loading matrix, E represents the residuals non explained by the model and n , m and npc are the number of samples, variables and principal components respectively [22].

A practical case of PCA is described in reference 24 where non-alcoholic beers were classified based on aftertaste sensory attributes such as bitter, sour, sweet, fruity, liquorice, artificial, body, intensity and duration [24].

3.3.2. Partial least squares-discriminant analysis

Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) is a chemometric method that allows us to classify samples into pre-established classes. In this method several sets of well-defined

samples belonging to the classes of interest are used to create a model which will then be applied to assign unknown samples to each class. The model is validated by testing an external set of samples and evaluating its ability to correctly assign the samples to their class.

Typical applications of PLS-DA in chemistry include the classification of samples according to their region or time of origin and classification of molecules according to their properties [25]. As an example Serrano-Lourido *et al* used PLS-DA to discriminate wines of three different Spanish appellations (Penedés, Rioja and Ribera del Duero) based on thirteen phenolic compounds [26].

3.3.3. Pre-treatment of data

The purpose of preprocessing is to try to transform the data into the most suitable form for the analysis. In fact, pre-processing can make the difference between a useful model and no model at all [23,25].

Variables often have substantially different numerical ranges. A variable with a large range has a large variance, whereas a variable with a small range has a small variance. Since PCA is a maximum variance projection method, it follows that a variable with a large variance is more likely to be expressed in the modelling than a low-variance variable [25].

In order to give all variables equal weight in the data analysis we standardize them. With mean-centering the average value of each variable is calculated and then subtracted from the data. With scaling we ensure that each scaled variable gets the same variance. The combination of mean-centering and scaling is often called autoscaling. A graphical interpretation of mean-centering and scaling is shown in figure 6 [23,25].

In the case of spectrums there are other useful pre-treatments such as baseline correction and synchronization (see section 6.1).

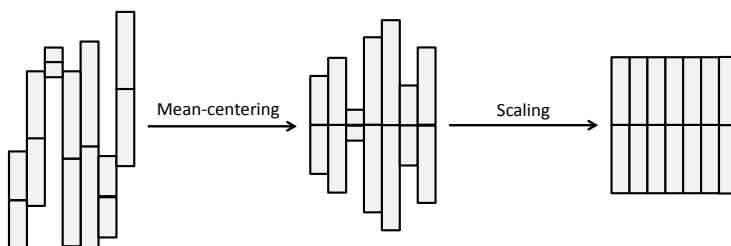


Figure 6. Graphical interpretation of mean-centering and scaling

4. OBJECTIVES

The aim of this work is to study whether the polyphenolic profile obtained by high performance liquid chromatography with UV detection can be used to discriminate amongst beers from different styles and region of origin. For this reason 63 beers from different styles and countries have been analyzed and compared by chemometric methods.

In order to achieve this goal several studies have been carried out, the objectives of which have been the following:

- Optimize data pre-treatment so variability of the analysis method does not affect the sample distribution.
- Study sample distribution by PCA in order to identify possible discriminating factors among beers.
- Evaluate whether discrimination among classes is possible by PLS-DA. In particular, classification of samples via type and origin will be studied.

5. EXPERIMENTAL

5.1. REACTIUS, PATRONS I DISSOLVENTS

Els reactius utilitzats en aquest treball són:

- Àcid fòrmic (98-100% p/p, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA)

Els reactius estàndards emprats en aquest treball, tots ells proporcionats per Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), són:

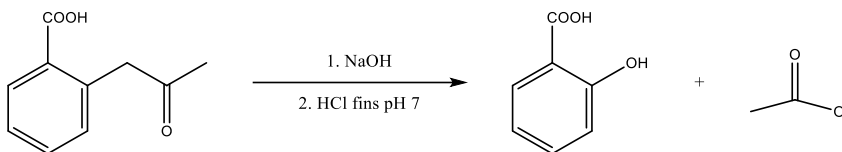
- Àcid gàl·lic (CAS 149-91-7)
- Àcid protocatèquic (CAS 69-72-7)
- Àcid gentísic (CAS 490-79-9)
- Hidrat de (+)-catequina (CAS 225937-10-0)
- Àcid vaníl·lic (CAS 121-34-6)
- Àcid cafeic (CAS 331-39-5)
- Àcid siríngic (CAS 530-57-4)
- (-)-Epicatequina (CAS 490-46-0)
- Àcid p-cumàric (CAS 501-98-4)
- Àcid ferúlic (CAS 537-98-4)
- Àcid acetilsalicílic (CAS 50-78-2)
- Hidrat de rutina (CAS 207671-50-9)
- Quercetina (CAS 117-39-5)

Els dissolvents emprats per a la fase mòbil i per a la dissolució de patrons són:

- Metanol grau UHPLC-Supergradient (99.9% Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, Espanya)
- Aigua mili-Q (Millipore, Milford, Massachusetts, EUA)
- Dimetilsulfòxid (>99% v/v Merck, Hohenbrunn, Alemanya)

5.1.1. Preparació dels patrons polifenòlics

S'han preparat solucions individuals de cada patró de l'ordre de 5000 mg/L emprant DMSO com a dissolvent. En el cas de l'àcid salicílic aquest s'ha obtingut a partir de l'àcid acetilsalicílic seguint l'esquema 1 i la concentració aproximada és de 2500 mg/L. Aquestes són les solucions mares emprades posteriorment per a la preparació de les mescles de solucions patró utilitzades en els posteriors estudis. A la taula 4 es mostra les concentracions de cada patró.



Esquema 1. Preparació de l'àcid salicílic

Tant les solucions patró de cada compost individual com les diferents mescles s'han conservat a la nevera i s'han diluït 1:1 amb aigua abans d'injectar-les al cromatògraf.

Taula 4. Concentracions de les dissolucions mares dels patrons polifenòlics.

Compost	Massa [mg]	Concentració [mg/L]
Àcid gàl·lic	54.0	5400.0
Àcid protocatèquic	52.0	5200.0
Àcid gentísic	52.1	5210.0
(+)-Catequina	53.3	5018.8
Àcid vanil·lic	51.1	5110.0
Àcid cafeic	51.2	5120.0
Àcid siringic	50.7	5070.0
(-)-Epicatequina	49.2	4920.0
Àcid p-cumàric	49.9	4990.0
Àcid ferúlic	49.3	4930.0
Àcid salicílic	166.3	2549.9
Rutina	52.3	5080.2
Quercetina	53.0	5002.1

5.1.2. Mostres

Les mostres són cerveses de diferents marques i varietats adquirides a grans superfícies de Barcelona. Les mostres han estat diluïdes 1:1 amb DMSO abans de la seva injecció al cromatògraf de líquids.

5.2. INSTRUMENTACIÓ

5.2.1. Instruments i aparells

El sistema emprat consta d'un cromatògraf Agilent Series 1100 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EUA) equipat amb una bomba quaternària (G1311A), un desgassificador (G1322A), un injector automàtic (G1392A) i un detector de díode array (G1315B). Tots els mòduls pertanyen a la sèrie 1100 a excepció de l'autoinjector, que pertany a la sèrie 1200.

Per al control de l'instrument i l'adquisició i anàlisi de dades s'ha utilitzat el software Agilent ChemStation for LC 3D (Rev. A. 10.02). Per al tractament quimiomètric de les dades s'ha emprat el programa MATLAB (versió 6.5.0. 180913a Release 13, The MathWorks, Inc).

5.2.2. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica s'ha dut a terme amb una columna Kinetex C18 (100 mm x 4.6 mm I.D.) de mida de partícula 2.6 μm i mida de porus 100 Å i amb una precolumna Gemini C18 (4.0 mm x 6.0 mm I.D.), totes dues de Phenomenex, Torrance, California, EUA.

El mètode cromatogràfic emprat ha estat prèviament optimitzat en el grup de treball. La fase mòbil consisteix en una mescla de fase aquosa (A) acidificada amb àcid fòrmic 0,1% (v/v) i fase orgànica (B) de metanol. El cabal és de 1 mL·min⁻¹ i el volum d'injecció 10 μL . El gradient d'elució emprat es mostra a la taula 5.

Taula 5. Gradient d'elució aplicat per a la separació cromatogràfica.

Temps (min)	A [%]	B [%]	Mode d'elució
0-11.5	95 → 74	5 → 26	Lineal
11.5-19	74 → 40	26 → 60	Lineal
19-20	40 → 10	60 → 90	Lineal
20-23	10	90	Isocràtic
23-23.15	10 → 95	90 → 5	Lineal
23.15-25	95	5	Isocràtic

S'han enregistrat els cromatogrames a 5 longituds d'ona diferents (280, 310, 370, 420 i 520 nm) per a les mesures d'absorbància UV-Vis. També s'han enregistrat els espectres d'absorbància UV-Vis en l'interval 190-720 nm per comprovar la puresa dels pics dels anàlits a les mostres respecte els patrons.

6. TRACTAMENT DE DADES

6.1. SINCRONITZACIÓ DELS CROMATOGRAMES

La matriu de dades emprada inicialment ha estat creada a partir dels cromatogrames obtinguts per a les diferents cerveses a 280 nm. En aquesta matriu cada fila correspon a una mostra diferent i a les diferents columnes es troben les intensitats mesurades al llarg del cromatograma. Per fer el tractament de dades, en lloc d'emprar el temps de retenció, s'ha treballat amb la posició que ocupa cada valor a la matriu (canal).

Si representem en un mateix gràfic els cromatogrames obtinguts per a tres replicats de dues mostres diferents (figura 7a) es poden observar variacions de la línia base i dels temps de retenció degudes a la variabilitat del mètode cromatogràfic.

Donat que com a pretractament s'han autoescalat les dades, al construir el model petites variacions a la línia base o als temps de retenció prendran igual d'importància que variacions en l'alçada dels pics. Per tant, és important minimitzar les variacions degudes al mètode d'anàlisi per tal que les diferències entre cromatogrames es deguin únicament a diferències entre les mostres i es pugui obtenir un bon model de PCA.

En un primer pas s'han eliminat les zones de l'inici i el final del cromatograma, que corresponen al front de fase mòbil i al gradient. Aquesta correcció es mostra gràficament a la figura 7b.

A continuació s'ha provat de sincronitzar els diferents cromatogrames fent coincidir els pics que apareixen al voltant del canal 1080 (figura 7c) i ajustant la línia base en el canal 1045 (figura 7d).

Per sincronitzar els cromatogrames es busca el màxim entre els punts a i b (figura 8) i després s'agafa una finestra de $n+m+1$ punts. Per a ajustar la línia base es resta el valor d'intensitat del punt seleccionat (no ha de pertànyer a cap pic en cap de les mostres) a tot el cromatograma.

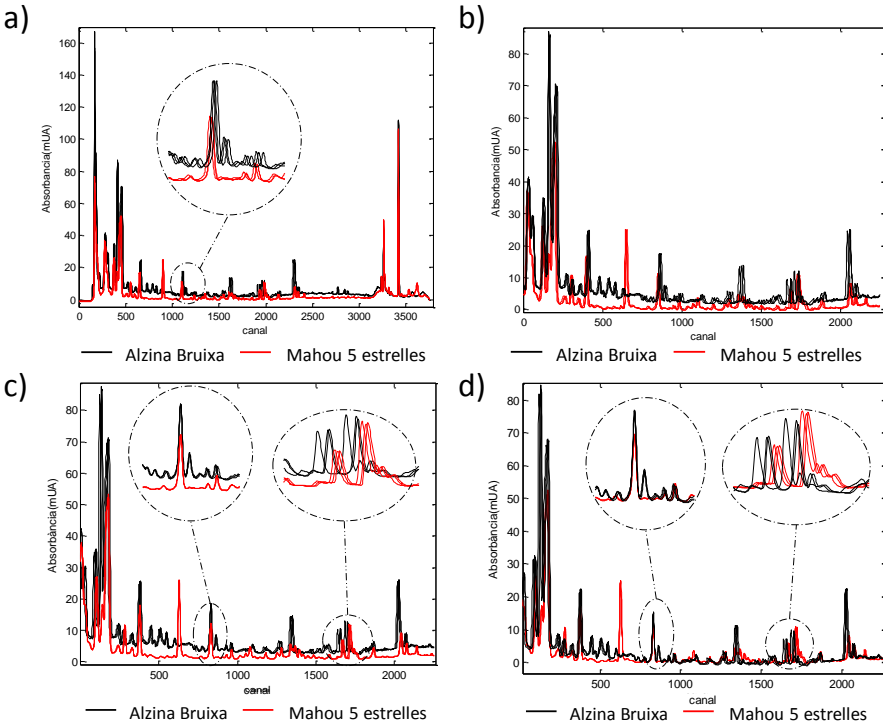


Figura 7. Cromatogrames de diferents cerveses (a) sense modificar, (b) eliminant les parts de l'inici i del final, (c) alineant pel canal 1080 i (d) ajustant la línia base.

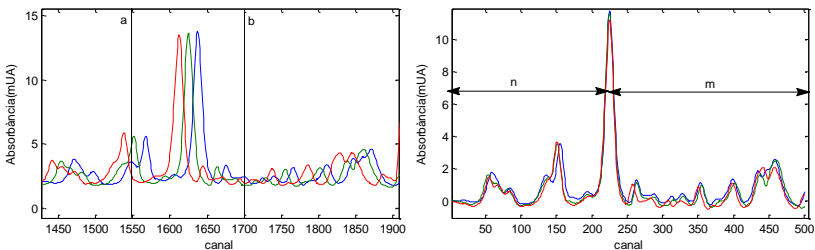


Figura 8. Procés de sincronització considerant $a=1550$, $b=1700$, $n=225$ i $m=275$.

Es pot observar que aquestes correccions fan disminuir significativament les diferències entre els replicats d'una mateixa mostra al voltant de la zona que s'ha emprat com a referència (figura 7d, finestra a 1100) però que aquestes millores no es mantenen al llarg de tot el cromatograma (figura 7d, finestra a 1900).

Així, es pot millorar la sincronització entre els diferents cromatogrames si es divideix en seccions i es corregeix individualment cada secció abans de tornar-les a ajuntar per tenir un únic cromatograma. En aquest treball s'ha dividit cada cromatograma en 11 seccions que contenen els pics més característics (figura 9). La figura 10 mostra el cromatograma que resulta després de sincronitzar cada secció per separat i tornar-les a ajuntar.

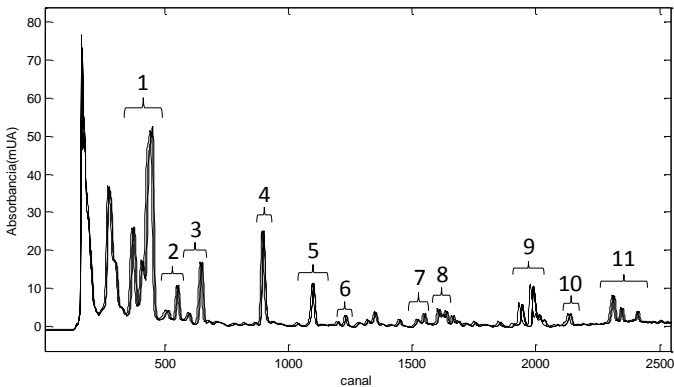


Figura 9. Divisió del cromatograma en 11 seccions.

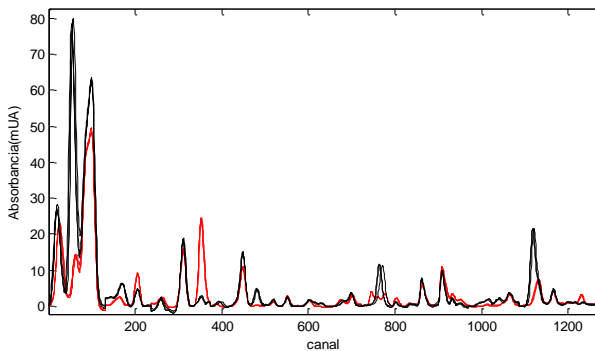


Figura 10. Cromatograma resultant de la unió de les 11 seccions.

6.2. CÀLCUL DE L'ÀREA

Al sincronitzar els cromatogrames de diferents mostres s'ha observat que hi ha mostres que presenten pics característics en zones del cromatograma que no s'han considerat en cap de les 11 seccions triades per a la sincronització. Aquests pics, que podrien ser un tret diferencial d'aquest tipus de mostres, no es poden incloure en les dades tractades ja que la resta de

mostres no presenten cap pic proper que es pugui emprar com a referència durant la sincronització.

Una opció que permet incloure aquestes zones és treballar amb l'àrea del cromatograma. D'aquesta manera, a més de poder incloure zones on només algunes mostres contenen pics, també es poden reduir diferències entre replicats d'una mateixa mostra ja que encara que alguns pics estiguin una mica més solapats en algun dels replicats l'àrea serà la mateixa.

Per al càlcul de l'àrea s'han emprat les mateixes 11 seccions que per a la sincronització dels cromatogrames i s'han addicionat dues seccions més, una a l'inici i una al final. Les 13 seccions resultants s'han dividit en un total de 27 seccions més petites per calcular l'àrea (figura 11). L'àrea de les diferents seccions s'ha estimat a partir de la suma de totes les intensitats.

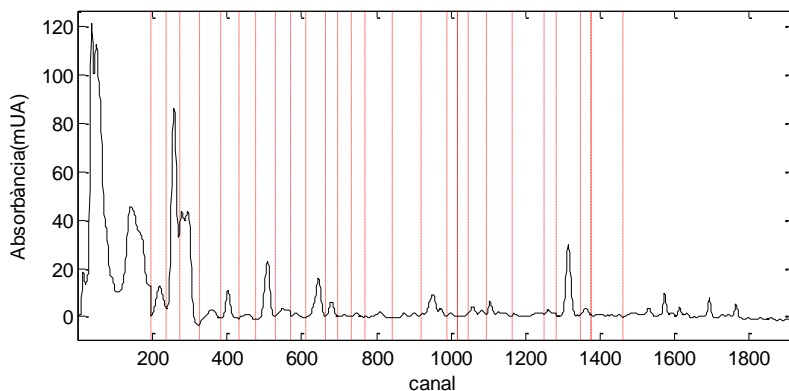


Figura 11. Divisió del cromatograma en 27 seccions per calcular l'àrea.

En el cas de l'última secció és especialment important ajustar bé la línia base abans de calcular l'àrea ja que es tracta d'una secció bastant gran on els pics no són gaire intensos. Així, es pot donar el cas que s'obtingui un valor d'àrea més gran per a una mostra que no presenta pics en aquesta zona que per a una que sí que en presenta si la primera té la línia base per sobre la segona. Per tal d'evitar aquests casos la línia base s'ha ajustat considerant el valor mitjà del soroll com a zero.

7. RESULTATS I DISCUSSIÓ

7.1. IDENTIFICACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS COMPOSTOS POLIFENÒLICS

En aquest treball s'han estudiat 13 compostos polifenòlics: els àcids gàl·lic (1), protocatèquic (2), gentísic (3), vaníl·lic (5), cafeic (6), siringic (7), p-cumàric (9), ferúlic (10) i salicílic (11); la (+)-catequina (4), la (-)-epicatequina (8), la rutina (12) i la quercetina (13). Aquests compostos són alguns dels polifenols més abundants a la cervesa segons constata la bibliografia.

Prèviament a aquest treball, en el grup de treball ja s'havia optimitzat la seva separació en una mescla aigua-DMSO (1:1) i l'ordre d'elució, els temps de retenció i la longitud d'ona de treball òptima ja eren coneguts. La figura 12 mostra els cromatogrames obtinguts a 280 (a), 310 (b) i 370 (c) nm, on s'han assenyalat els pics corresponents a cada compost.

Degut a la complexitat de la matriu de la cervesa, per tal de poder identificar el pic corresponent a cada compost polifenòlic no és suficient conèixer el temps de retenció dels patrons sinó que cal injectar una mescla de cervesa amb patrons i comparar el cromatograma obtingut amb el cromatograma de la cervesa sola. Aquest procediment s'ha realitzat per a cada mostra de cervesa i la concentració de patrons injectada a la mescla ha estat de 2 mg/L. La figura 13 mostra els cromatogrames obtinguts per a la cervesa Mahou clàssica amb i sense patrons a diferents longituds d'ona. S'han assenyalat els pics corresponents a cada compost polifenòlic estudiat. Aquesta mostra en concret no contenia àcid protocatèquic, àcid salicílic ni quercetina.

La quantificació s'ha realitzat mitjançant una recta de calibratge externa. La taula 6 mostra, per a cada compost, el pendent, l'ordenada a l'origen, el coeficient de correlació, l'interval de treball i el límit de detecció. El calibratge s'ha realitzat abans de cada sèrie d'injeccions i per a cada mostra s'han fet tres replicats.

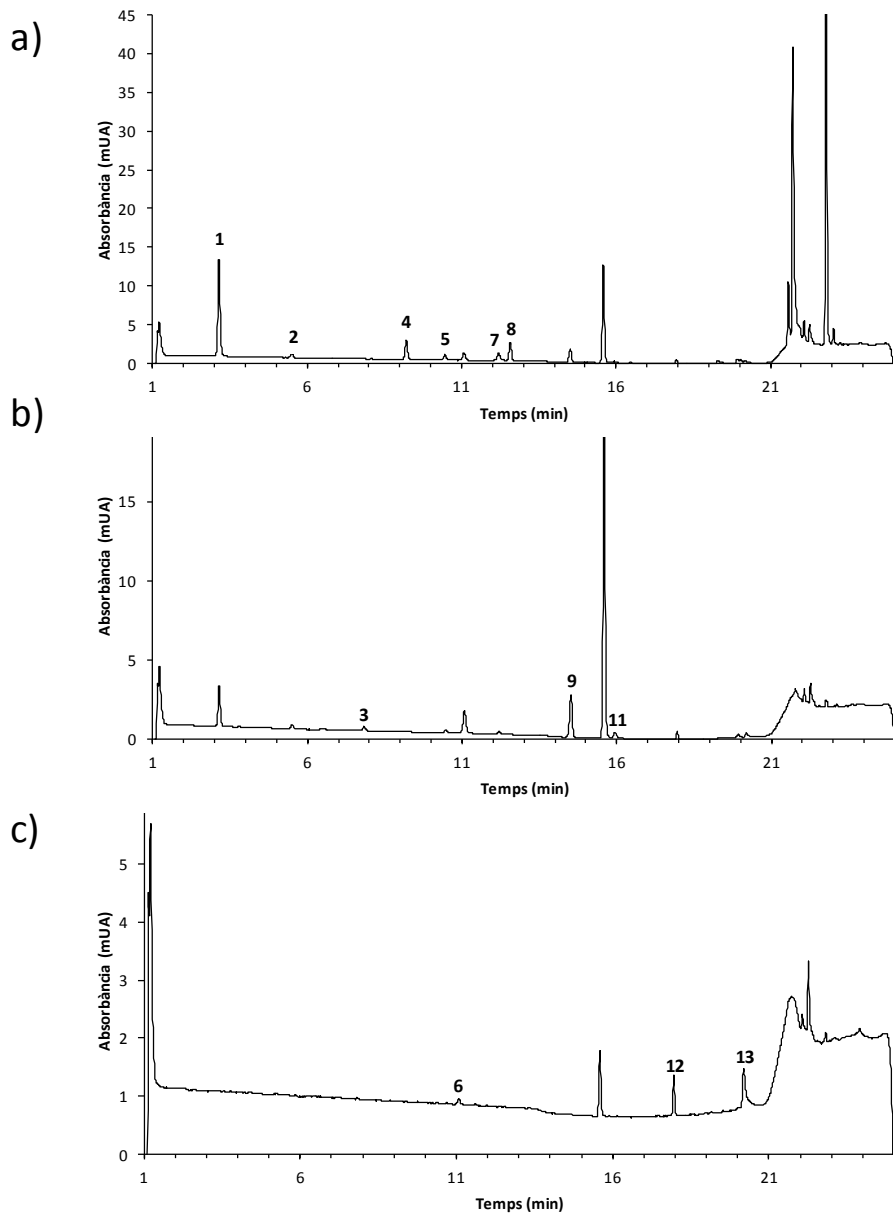


Figura 12. Cromatogrames de la mescla de patrons en aigua:DMSO (1:1) a diferents longituds d'ona:

(a) 280 nm, (b) 310 nm i (c) 370 nm

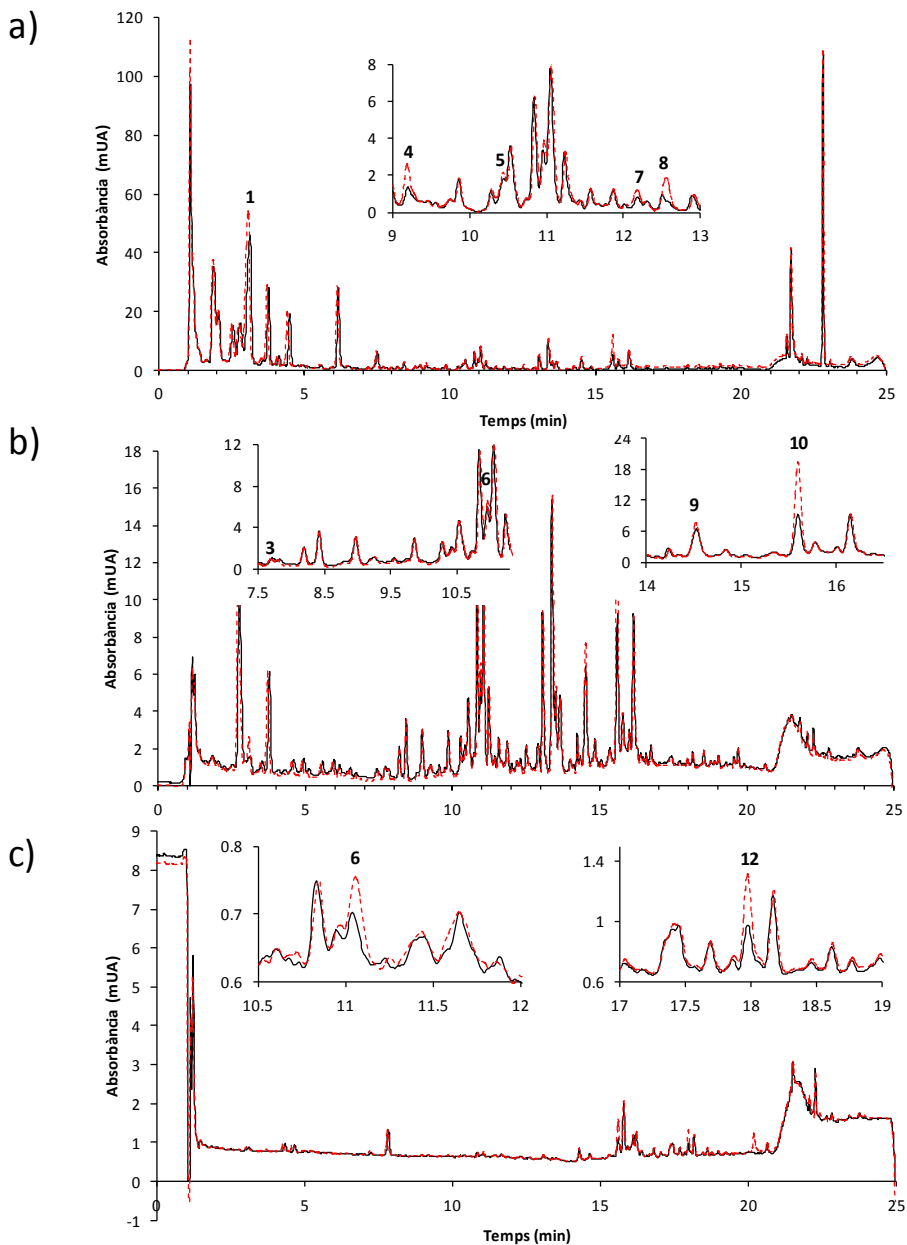


Figura 13. Cromatogrames de la mescla de la cervesa (—) i de la mescla de patrons en cervesa (---)a diferents longituds d'ona: (a) 280 nm, (b) 310 nm i (c) 370 nm

Taula 6. Paràmetres de la recta de calibratge. El pendent i l'ordenada a l'origen corresponen a la recta de calibratge del dia 10 de març.

Compost	Pendent	Ordenada a l'origen	R ²	LOD [mg/L]	Interval de treball [mg/L]
Àcid gàl·lic	31.506	0.410	≥ 0.991	0.008	0.5-20
Àcid protocatèquic	16.291	0.075	≥ 0.990	0.027	0.05-2
Àcid gentísic	8.965	-0.158	≥ 0.9988	0.026	0.05-2
(+)-Catequina	6.982	0.601	≥ 0.9991	0.030	0.5-20
Àcid vanil·lic	20.767	0.164	≥ 0.9992	0.017	0.05-2
Àcid cafeic	3.290	-0.084	≥ 0.9991	0.018	0.05-2
Àcid siríngic	28.308	1.365	≥ 0.9991	0.140	0.05-2
(-)-Epicatequina	6.689	0.432	≥ 0.9990	0.051	0.5-20
Àcid p-cumàric	82.921	-0.334	≥ 0.9992	0.005	0.05-2
Àcid ferúlic	51.473	1.824	≥ 0.9990	0.007	0.5-20
Àcid salicílic	9.593	0.269	≥ 0.9957	0.029	0.05-2
Rutina	13.647	0.037	≥ 0.9991	0.026	0.05-2
Quercetina	35.510	-1.450	≥ 0.9960	0.042	0.05-2

7.2. ESTUDI DE LA DEGRADACIÓ DE LES MOSTRES AL LLARG DEL TEMPS

Per tal d'avaluar si el fet de tenir les cerveses obertes abans d'injectar-les afavoreix la seva degradació s'han anat obrint llaunes d'un mateix lot de cerveses (Mahou clàssica) al llarg de dues setmanes de manera que a l'injectar-les portessin 0, 1, 3, 6, 9 i 14 dies obertes. En tots els casos s'ha conservat una part de la mostra a temperatura ambient i la resta a la nevera.

La degradació de les mostres s'ha avaluat mitjançant la concentració dels 10 compostos polifenòlics presents a la mostra.

Gairebé tots els polifenols avaluats presenten el mateix patró de cinètica de degradació. Com a tall d'exemple la figura 14 mostra la cinètica de degradació de l'àcid gentísic, on es pot comprovar que, al conservar les mostres a la nevera, no s'observa degradació. Al conservar les mostres a temperatura ambient, no obstant, sí que es pot observar com la concentració disminueix lleugerament amb el temps.

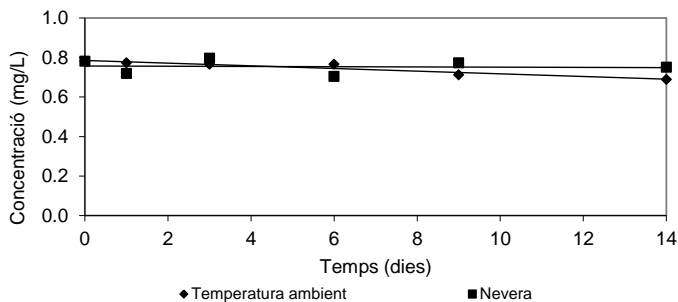


Figura 14. Cinètica de degradació de l'àcid gàl·lic

La figura 15 mostra la cinètica de degradació de la (+)-catequina. En aquest cas es pot observar també l'absència de degradació quan les mostres es conserven a la nevera. Quan les mostres es conserven a temperatura ambient però, la concentració de (+)-catequina augmenta considerablement al llarg del temps. Aquest fet indica que la cervesa conté polifenols més grans que, al degradar-se, alliberen (+)-catequina.

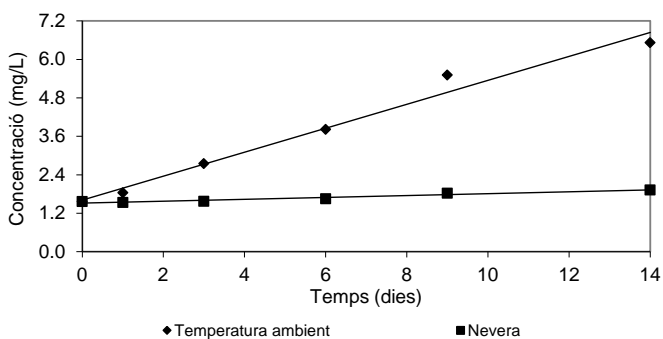


Figura 15. Cinètica de degradació de la (+)-catequina

Els resultats obtinguts en aquest apartat mostren que, sempre i quan es conservin a la nevera, les mostres es poden mantenir obertes durant dues setmanes sense que això comporti grans diferències a la seva composició.

7.3. ESTUDI DE L'EFECTE DE MATRIU

Per tal d'avaluar si la cervesa provoca efecte de matriu o no s'han injectat tres sèries de patrons. A la primera sèrie els patrons es trobaven dissolts en aigua:DMSO (1:1) i en les altres dues sèries en cervesa:DMSO (1:1). La cervesa emprada per aquest estudi ha estat també la Mahou clàssica.

En la majoria de casos el pendent de la recta de calibratge obtinguda en aigua o cervesa no varia significativament, fet que indica l'absència d'efecte de matriu. La figura 16 mostra les rectes obtingudes per a l'àcid p-cumàric.

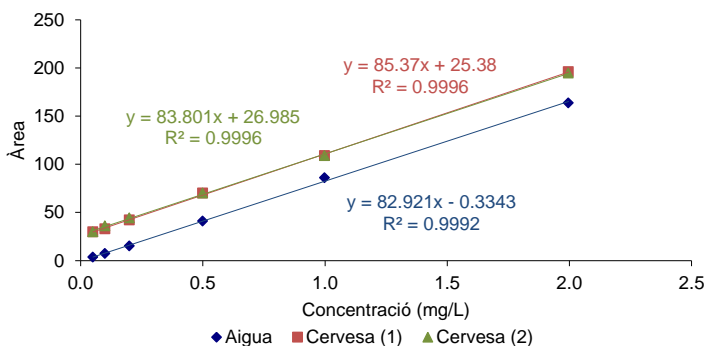


Figura 16. Rectes de calibratge obtingudes per a l'àcid p-cumàric.

Hi ha casos però, en què el pendent de la recta de calibratge sí que varia segons es dissolguin els patrons en aigua o en cervesa. Un exemple d'aquest comportament és l'àcid cafeïc (figura 17).

En tots aquests casos els pics corresponents als patrons se solapen amb altres pics de la cervesa, fet que dificulta la seva integració. En el cas de l'àcid cafeïc aquest problema es pot solucionar mesurant-lo a 370 nm en lloc de a 310 nm ja que, tot i presentar menys sensibilitat, la selectivitat millora considerablement. Així, mesurant l'àcid cafeïc a 370 nm s'obtenen pendents gairebé iguals per als patrons dissolts en aigua o en cervesa, fet que confirma que no hi ha efecte de matriu.

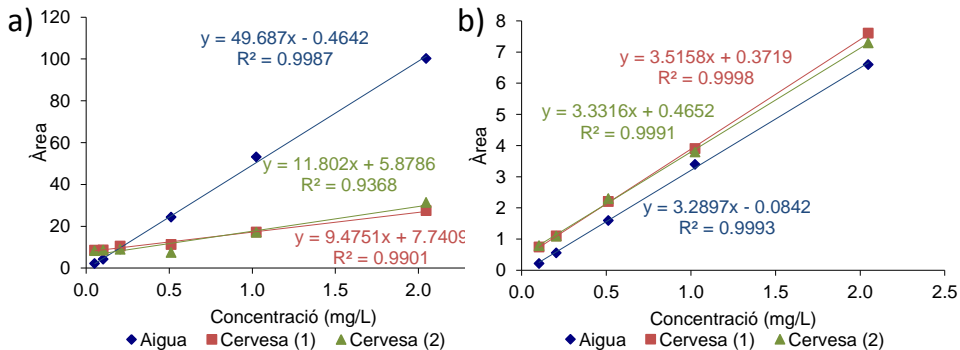


Figura 17. Rectes de calibratge obtingudes per a l'àcid cafeic a (a) 310 nm i (b) 370 nm.

7.4. ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DE L'ENVÀS

Per tal d'avaluar si l'envàs de la cervesa té efectes significatius sobre la seva composició s'han analitzat sis cerveses Steinburg clàssiques. Les tres primeres mostres corresponen a llaunes de 33 cL del mateix lot, la quarta a una llauna de 33 cL d'un lot diferent i la cinquena i la sisena a ampolles de vidre de 25 cL i 1 L respectivament.

Per a cada mostra s'han realitzat tres replicats independents per avaluar la variació deguda a la preparació de les mostres. En el cas del primer replicat de la primera mostra s'han realitzat tres injeccions per tal de poder avaluar la variació deguda al propi cromatògraf.

Per tal de minimitzar l'efecte de possibles derives al llarg de la sèrie d'injeccions, les diferents mostres i replicats s'han injectat aleatòriament. Alguns dels replicats però, s'han hagut de descartar degut a la manca de reproductibilitat del cromatograma.

Per comparar les diferents mostres s'ha tingut en compte la concentració dels 13 compostos polifenòlics. Tots els polifenols estudiats mostren un comportament semblant. Com a exemple, les figures 18 i 19 mostren els resultats obtinguts per a l'àcid ferúlic.

Tal com es pot veure a la figura 18 l'error comès pel cromatògraf a l'injectar (mostres 1-1-1, 1-1-2 i 1-1-3) és comparable a l'error comès durant la preparació de les mostres (mostres 3-1, 3-2 i 3-3).

Tal com es mostra a la figura 19 les concentracions obtingudes per les diferents llaunes és similar tant si les llaunes pertanyen al mateix lot (mostres 1, 2 i 3) o a un lot diferent (mostra 4).

A més, també es pot observar que la concentració obtinguda per a les diferents ampolles (mostres 5 i 6) tampoc difereix considerablement de la concentració obtinguda per a les diferents llaunes.

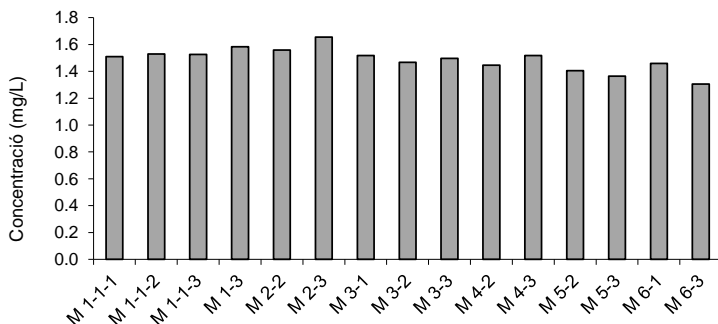


Figura 18. Concentració d'àcid ferúlic obtinguda per a les diferents mostres i replicats.

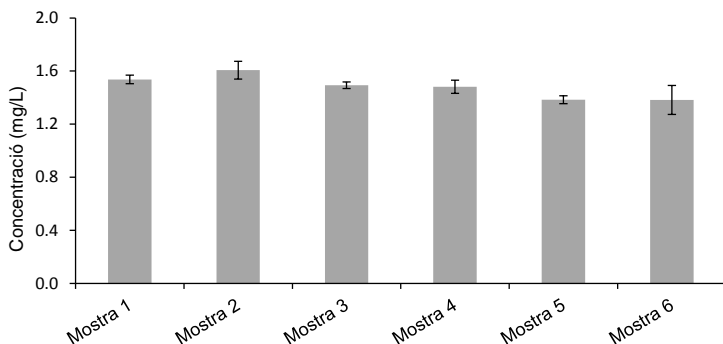


Figura 19. Concentració d'àcid ferúlic segons el lot i el tipus d'envàs.

Per tant, es pot concloure que el lot i l'envàs no afecten a la concentració dels polifenols presents a les cerveses. En conseqüència, en els estudis posteriors realitzats en aquest treball no s'ha tingut en compte el tipus d'envàs al triar les mostres.

7.5. ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS

S'han analitzat un total de 63 cerveses de diferents estils i països. A l'annex 1 es dona un llistat de les diferents cerveses amb les seves característiques principals. Per tal d'assegurar

que el fet de realitzar l'anàlisi en diferents dies no afectava els resultats s'han introduït mostres control (Mahou 5 estrelles) a les diferents sèries d'injeccions i s'ha anat controlant que els diferents replicats apareguessin sempre a la mateixa zona del mapa de PCA.

7.5.1. Cromatogrames

Per tal de comprovar l'efectivitat del tractament de dades explicat a l'apartat 6.1 s'ha construït un model de PCA tant amb el cromatograma original (figura 20) com amb el cromatograma obtingut a partir de les 11 seccions (figura 21).

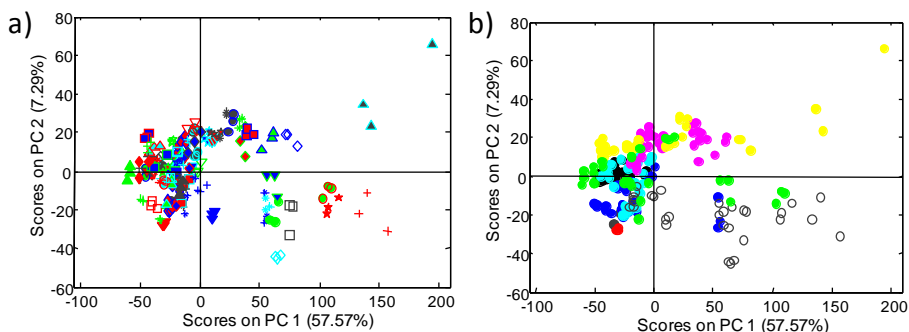


Figura 20. Model de PCA construït a partir del cromatograma original diferenciant les mostres per (a) marca i (b) dia en què es va realitzar l'anàlisi.

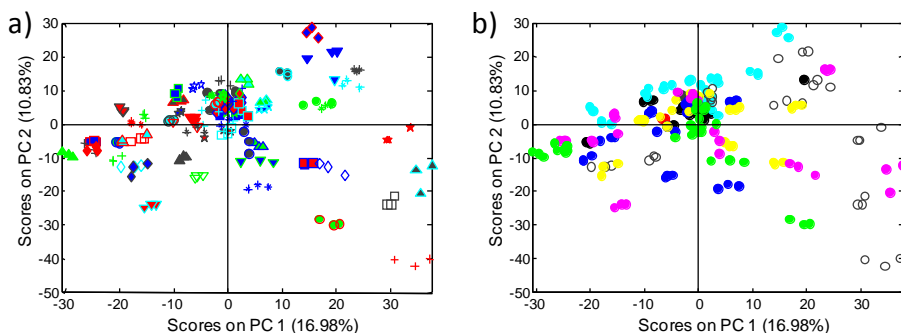


Figura 21. Model de PCA construït a partir de les dades tractades diferenciant les mostres per (a) marca i (b) dia en què es va realitzar l'anàlisi.

Es pot observar que el tractament de les dades millora considerablement el model obtingut. D'una banda, quan es parteix del cromatograma original es pot observar una major agrupació de les mostres analitzades en diferents dies mentre que al crear el model a partir de les dades

tractades el dia en què s'ha dut a terme l'anàlisi no influeix tant. D'altra banda, tractant les dades s'aconsegueix també que els diferents replicats d'una mateixa mostra apareguin més propers entre ells.

Un cop construït el model de PCA a partir de les dades tractades s'ha avaluat la distribució de les mostres segons el tipus de cervesa (figures 22 i 23). En una primera aproximació es pot observar una tendència de separació entre les cerveses ale i lager tot i que no hi ha dos grups clarament diferenciats l'un de l'altre. Aquest fet mostra que el tipus de fermentació sí que afecta la composició global de la cervesa però no prou com per poder predir amb seguretat el tipus de fermentació d'una mostra desconeguda a partir només del seu perfil cromatogràfic.

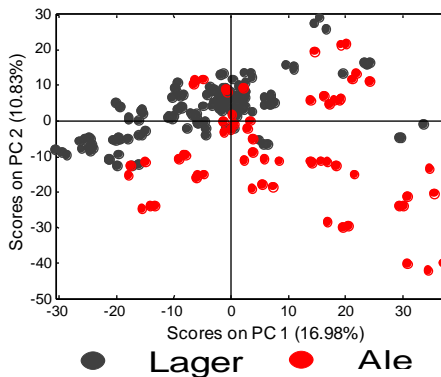


Figura 22. Distribució de les mostres de cervesa: *lager* i *ale*.

D'altra banda, si avaluem tipus de cervesa més específics (figura 23) podem observar que hi ha estils com les cerveses sense alcohol o les weissbier que formen un bloc més o menys compacte tot i no distanciar-se clarament de la resta de mostres. Aquest fet indica que totes les cerveses d'aquests estils tenen composicions molt semblant entre elles però no gaire diferent a la resta d'estils de cervesa. Cal mencionar també la particularitat de l'estil abadia, que s'estén al llarg de gran part del gràfic. Això es deu a que aquest estil no està definit en funció del procés de fabricació de la cervesa sinó que té a veure amb la tradició dels monjos trapistes. De fet, es poden observar tres subgrups dins les mostres abadies, cadascun dels quals prové d'un monestir diferent.

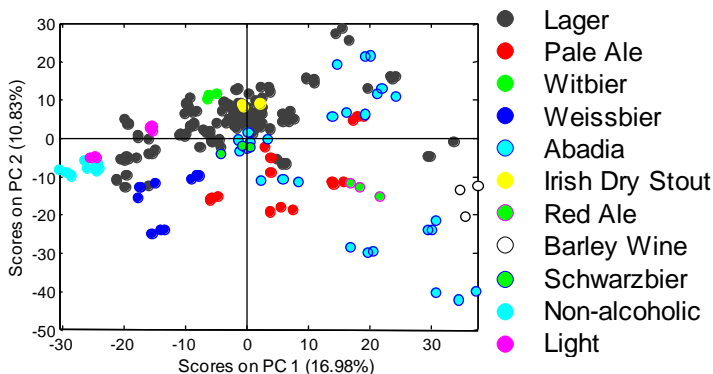


Figura 23. Distribució de les mostres segons l'estil de cervesa.

7.5.2. Àrees

S'ha construït un model de PCA a partir de les àrees calculades per a cada secció del cromatograma (apartat 6.2). Tal com es pot veure a la figura 24 la distribució de les mostres no difereix gaire de la distribució obtinguda a partir dels cromatogrames tractats.

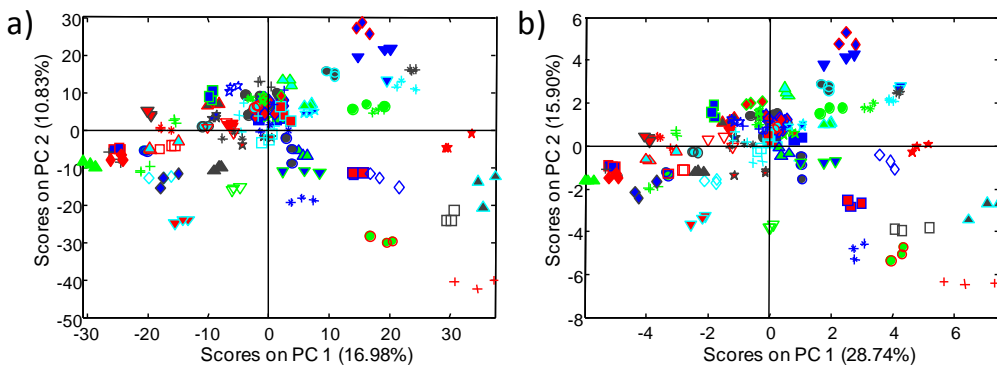


Figura 24. Model de PCA construït a partir de (a) els cromatogrames tractats i (b) les àrees diferenciant les cerveses per marca. Veure apèndix per a la correspondència símbol-mostra.

Aquest fet indica que les zones de cromatograma incloses al fer el càlcul de les àrees no aporten informació nova que permeti diferenciar entre les mostres. A més, les possibles millores que es puguin aconseguir respecte el solapament entre pics tampoc afecten de manera visible el model.

7.5.3. Concentracions

Per a la construcció del model de PCA s'han emprat les concentracions dels 13 compostos polifenòlics. En aquest cas la distribució de les mostres varia considerablement respecte a la obtinguda a partir de tot el cromatograma (figura 25). Aquest canvi en la distribució de les mostres es deu al fet d'emprar molta menys informació durant la construcció del model. No obstant, es tracta d'un model més robust ja que els valors de les concentracions no es veuen afectats per canvis en el temps de retenció o la línia base i altres variacions que es puguin produir entre diferents dies es minimitzen a través del calibratge.

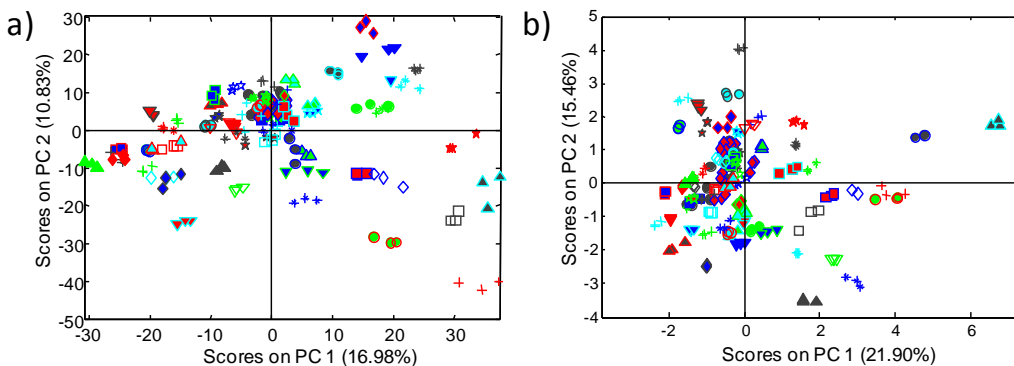


Figura 25. Model de PCA construït a partir de (a) els cromatogrames tractats i (b) les concentracions de 13 compostos polifenòlics diferenciant les cerveses per marca. Veure apèndix per a la correspondència símbol-mostra.

A l'avaluar la distribució de les mostres en funció del tipus de cervesa (figura 26a) es pot observar que la separació entre les cerveses ale i lager es fa més evident, fet que indica que el tipus de fermentació afecta a la concentració dels polifenols. Considerant el gràfic de *loadings* (figura 26b) es pot veure que les cerveses *ale* es caracteritzen per una major concentració de polifenols, a excepció dels àcids ferúlic i p-cumàric, que es troben en major quantitat a les cerveses *lager*. Aquesta tendència es pot observar també en general a la taula 7, on es donen les concentracions dels diferents polifenols obtingudes per a algunes de les mostres.

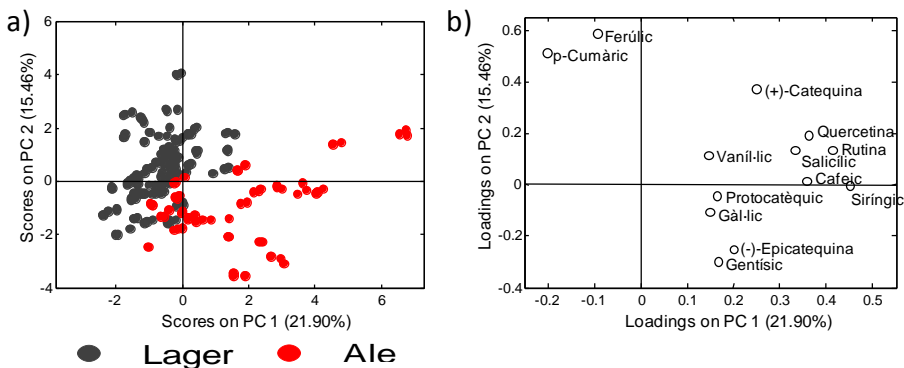


Figura 26. (a) Gràfic de scores diferenciant les mostres entre ale i lager. (b) Gràfic de loadings.

7.6. ANÀLISI DISCRIMINANT PER MÍNIMS QUADRATS PARCIALS

7.6.1. Diferenciació entre cerveses ales i lagers

El model de PLS-DA s'ha construït a partir de les concentracions de polifenols ja que per PCA s'ha vist que era el conjunt de dades que millor diferenciava entre les cerveses ale i lager.

Les mostres s'han dividit en dos blocs. El primer bloc, integrat per 13 cerveses ale i 24 cerveses lager, s'ha emprat per construir el model i el segon bloc, integrat per 8 cerveses ale i 16 cerveses lager, s'ha emprat per validar-lo. Tal com es pot veure a la figura 27 el model és capaç d'assignar correctament totes les mostres de validació.

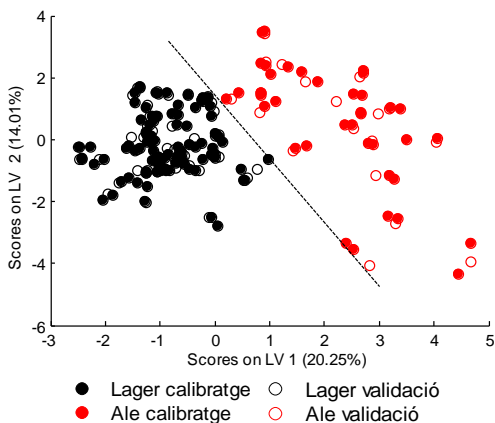


Figura 27. Classificació de les cerveses segons el tipus de fermentació mitjançant PLS-DA.

Taula 7. Concentració dels compostos polifenòlics analitzats en diferents mostres

Mostra	Concentració individual de cada polifenol [mg/L] ^a												
	Gal	Pro	Gen	Cat	Van	Caf	Sir	Epi	Cum	Fer	Sal	Rut	Que
<i>Cerveses Lager</i>													
San Miguel	41.6±0.8	0.21±0.02	nd	0.091±0.012	nd	0.38±0.05	0.232±0.004	1.93±0.05	0.850±0.013	2.21±0.04	nd	0.176±0.001	0.113±0.004
Estrella de Galicia	48.3±1.7	nd	nd	1.03±0.05	nd	0.54±0.07	0.166±0.011	1.93±0.09	0.94±0.03	2.15±0.07	nd	0.62±0.02	nd
Moritz	49.2±0.6	0.144±0.013	nd	0.128±0.010	nd	0.54±0.05	0.171±0.004	1.09±0.03	1.121±0.009	2.56±0.02	nd	1.045±0.018	nd
Cruzcampo	40.4±0.5	0.18±0.03	nd	0.52±0.07	nd	0.64±0.06	0.161±0.013	1.96±0.04	1.120±0.016	1.72±0.04	nd	0.701±0.018	nd
Xibeca Damm	32.3±0.7	nd	nd	4.35±0.19	nd	0.26±0.03	0.186±0.011	3.14±0.04	1.057±0.005	4.93±0.05	nd	0.165±0.009	nd
Heineken	45.7 ±1.3	0.11±0.03	0.29±0.03	1.1±0.3	0.022±0.011	0.31±0.02	0.32±0.03	2.06±0.15	0.327±0.015	1.367±0.016	1.468±0.016	0.016±0.003	0.134±0.002
Amstel Clásica	25.1±2.6	0.17±0.03	nd	0.34±0.04	nd	0.25±0.04	0.17±0.02	1.48±0.09	0.65±0.05	1.47±0.10	nd	0.027±0.002	nd
<i>Cerveses Ale</i>													
Sagra	42.0±1.3	5.2±0.2	0.412±0.013	3.65±0.17	0.35±0.02	0.66±0.03	0.62±0.06	1.57±0.08	0.460±0.008	1.628±0.003	0.015±0.005	2.07±0.02	0.213±0.002
Paulaner	17.7±0.6	1.19±0.02	0.016±0.007	1.35±0.05	0.499±0.011	0.41±0.03	0.436±0.004	nd	0.152±0.003	0.583±0.004	0.96±0.02	0.059±0.006	0.222±0.019
Franziskaner	20.2±0.7	0.83±0.06	0.161±0.012	0.90±0.09	1.45±0.06	0.33±0.02	nd	6.70±0.12	0.155±0.007	0.630±0.007	nd	0.065±0.010	nd
Weiss Damm	23.7±0.9	0.508±0.009	1.800±0.016	1.679±0.002	0.416±0.007	0.32±0.06	0.188±0.005	12.7±0.3	0.108±0.001	0.416±0.003	1.819±0.013	0.065±0.009	0.247±0.001
Leffe bruin	29.2±1.4	0.085±0.012	0.03±0.02	0.86±0.02	0.8±0.3	0.81±0.05	0.14±0.03	2.78±0.16	0.183±0.002	1.043±0.006	1.24±0.03	0.092±0.001	0.208±0.001
La Trappe Dubbel	30±9	nd	0.18±0.12	3.4±0.2	nd	0.43±0.05	1.39±0.04	1.95±0.09	0.222±0.019	1.015±0.017	5.5±0.3	0.903±0.017	0.218±0.018

(a) Gal, àcid gal·lic; Pro, àcid protocatèquic; Gen, àcid gentsísic; Cat, (+)-catequina; Van, àcid vanil·lic; Caf, àcid cafeic; Sir, àcid siríngic; Epi, (-)-epicatequina; Cum, àcid p-cumàric; Fer, àcid ferúlic; Sal, àcid salicílic; Rut, rutina; Que, quercetina; nd, no detectat

7.6.2. Diferenciació entre cerveses txeques i espanyoles

Un cop vist que el tipus de fermentació és un factor que afecta a la distribució de les cerveses en el mapa de PCA s'ha procedit a estudiar la distribució de les mostres en funció del seu país d'origen.

Amb aquest propòsit s'han seleccionat cerveses d'una mateix tipus (*lager*) originàries de diferents països i s'ha construït un model de PCA a partir de les concentracions de polifenols. En el gràfic de *scores* (figura 28) es pot observar que les cerveses txeques són les úniques que tenen característiques promig diferenciables de la resta. En el cas de les cerveses holandeses i daneses caldria ampliar el nombre de mostres a fi de poder avaluar si realment formen un grup diferenciat o no.

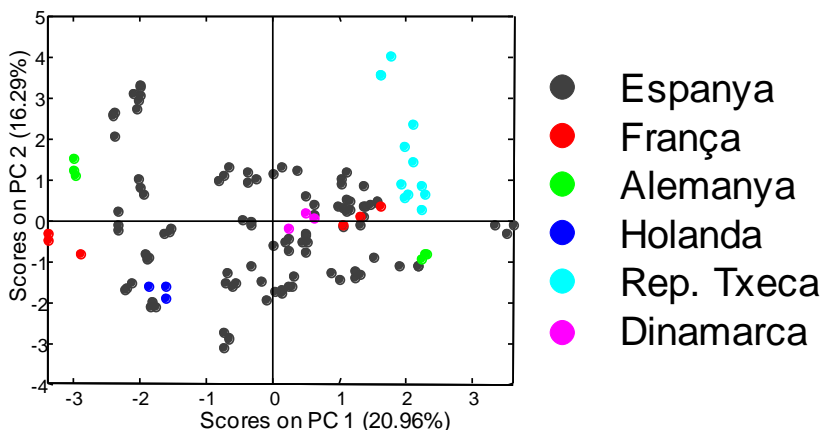


Figura 28. Classificació de les cerveses *lager* segons el seu país d'origen mitjançant PCA.

Degut a la falta de mostres franceses, alemanyes, holandeses i daneses, per al model de PLS-DA s'han considerat només les cerveses txeques i espanyoles. El model s'ha construït a partir de la concentració de polifenols en 8 cerveses txeques i 64 cerveses espanyoles i s'ha validat amb un segon bloc de mostres format per 4 cerveses txeques i 32 cerveses espanyoles. En el gràfic de *scores* (figura 29a) es pot observar que el model és capaç de predir correctament el país d'origen de totes les mostres emprades en la validació. En el gràfic de *loadings* (figura 29b) es pot observar que les cerveses txeques es caracteritzen per una major concentració de rutina i d'àcids p-cumàric, ferúlic i vanil·lic.

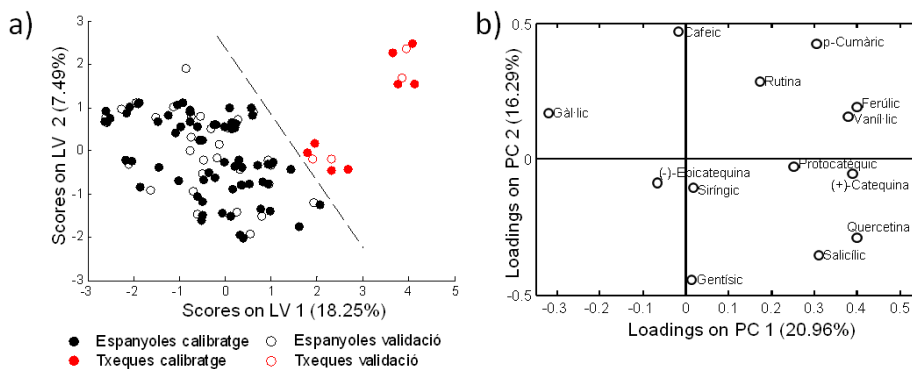


Figura 29. Classificació de les cerveses *lager* segons el seu país d'origen (Espanya o República Txeca) mitjançant PLS-DA. (a) Gràfic de scores, (b) gràfic de loadings.

10. CONCLUSIONS

After evaluating whether the polyphenolic profile obtained by HPLC with UV detection can be a useful tool for characterization of beers based on their style and region of origin some conclusions can be extracted:

- It is necessary to synchronize and adjust the baseline in chromatograms using several sections in order to correctly apply PCA and PLS-DA.
- Using the whole chromatogram is not enough to discriminate among beers from different styles.
- The area approach, although simpler per terms of data pre-treatment, does not remarkably improve the results obtained by using the whole chromatogram.
- Models based on polyphenols concentrations have been proven to be able to discriminate among beers from different styles and correctly assign new samples to each class.
- The fermentation process is the dominant factor in the distribution of beers obtained. Discrimination among beers from different countries can only be made given similar styles of beers.
- Beers in the ale family tend to present higher concentrations of polyphenols although ferulic and p-coumaric acids are more present in lager beers.

11. REFERENCES AND NOTES

1. Bueno, J. M.; Ramos-Escudero, F.; Sáez-Plaza, P.; Muñoz, A. M.; José Navas, M.; Asuero, A. G. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *42*, 102–125.
2. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–92.
3. Huang, W.-Y.; Cai, Y.-Z.; Zhang, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 1–20.
4. Amakura, Y.; Okada, M.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *891*, 183–8.
5. Leitao, C.; Marchioni, E.; Bergaentzlé, M.; Zhao, M.; Didierjean, L.; Taidi, B.; Ennahar, S. Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1249–55.
6. Fumi, M. D.; Galli, R.; Lambri, M.; Donadini, G.; De Faveri, D. M. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 568–573.
7. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231–46.
8. Aaby, K.; Hvattum, E.; Skrede, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4595–603.
9. Sturt, C.; Box, P. O.; Wagga, W. Critical Review Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review. **1997**, *122*, 11–34.
10. SEERAM, N. P. Berries. In *Nutritional Oncology*; Elsevier Inc., 2006.
11. Merken, H. M.; Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577–99.
12. Molnár-Perl, I.; Füzfai, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 201–227.
13. Feasey, P. A brief history of beer. In *Festival on food: 39th annual AIFST convention*; Australian Institute of Food Science and Technology, 2007; Vol. 59, pp. 191–196.
14. Bamforth, C. W. *Beer: Health and Nutrition*; Blackwell Science, 2004.
15. Craft, T.; Revolution, B. The Basics of Beer. *Beer 101* **1981**.
16. Buiatti, S.; Science, F. Beer Composition: An Overview. In *Beer in health and disease prevention*; Elsevier: Amsterdam, 2008.
17. Vinson, J. a; Mandarano, M.; Hirst, M.; Trevithick, J. R.; Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5528–33.
18. Pavlsler, A.; Buiatti, S. Non-lager Beer. In *Beer in health and disease prevention*; Elsevier: Amsterdam, 2008.
19. Pavlsler, A.; Buiatti, S. Lager Beer. In *Beer in health and disease prevention*; Elsevier: Amsterdam, 2008.
20. International trappist association <http://www.trappist.be/>.

21. Cerveceros de España. <http://www.cerveceros.org/>
22. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*; Elsevier: Amsterdam, 1997.
23. Esbensen, K. H.; Guyot, D. *Multivariate Data Analysis-in practice*; 4th ed.; Camo: Trondheim, 2000.
24. Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Mohtasebi, S. S.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Lozano, J.; Razavi, S. H.; Ahmadi, H.; Apetrei, C. Classification of non-alcoholic beer based on aftertaste sensory evaluation by chemometric tools. *Expert Syst. Appl.* **2012**, *39*, 4315–4327.
25. Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Trygg, J.; Wikström, C.; Wold, S. *Multi- and Megavariate Data Analysis. Part I*; Umetrics AB: Umea, 2006.
26. Serrano-Lourido, D.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Checa, A. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1425–31.

12. ACRONYMS




CE	Capillary Electrophoresis / Electroforesis capil·lar
DAD	Diode Array Detection / Detecció en sèrie de diodes
DMSO	Dimethyl sulfoxide / Dimetil sulfòxid
GC	Gas Chromatography / Cromatografia de gasos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia de líquids d'alta resolució
I.D	Internal diameter / Diàmetre intern
MS	Mass Spectrometry / Espectrometria de masses
PC	Principal Component / Component principal
PCA	Principal Component Analysis / Anàlisi de components principals
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis / Anàlisi discriminant per mínims quadrats parcials
UV	Ultraviolet / Ultraviolat

APPENDICES

Appendix 1: List of beer samples

Núm	Símbol	Nom	Tipus	Subtipus	Color	Fabricat a	Envàs ^a
1	●	San Miguel Especial	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	A. 25 cL
2	▼	Mahou Clásica	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
3	✱	Estrella Damm	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
4	■	Estrella Galicia Especial	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 50 cL
5	⊕	Amstel Clásica	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
6	◇	Moritz	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	A. 50 cL
7	▲	Koenigsbier	Lager	Pale Lager	Rossa	França/ Alemanya	LI. 33 cL
8	★	Cruzcampo	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	LI. 50 cL
9	●	Xibeca Damm	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	A. 25 cL
10	▼	Carrefour	Lager	Pilsener	Rossa	Alemanya	LI. 33 cL
11	✱	Ambar Especial	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
12	□	Argus	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
13	⊕	Lager Premium	Lager	Pale Lager	Rossa	Holanda	LI. 33 cL
14	◆	Mahou 5 Estrellas	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
15	▲	Heineken	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
16	★	Ambar Especial Celiacos	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	A. 33 cL
17	●	Amstel	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
18	▽	Alzina Cargol	Ale	Pale Ale	Rossa	França	A. 33 cL
19	✱	Alzina Bruixa	Ale	Pale Ale	Negra	França	A. 33 cL
20	■	Steinsburg Clásica	Lager	Pale Lager	Rossa	França	LI. 33 cL
21	■	Alhambra Reserva 1925	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	A. 33 cL
22	⊕	A.K. Damm	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	A. 33 cL
23	◆	Steinburg Ley de Pureza Alemana	Lager	Pale Lager	Rossa	França	A. 50 cL
24	▲	San Miguel 1516	Lager	Pilsener	Rossa	Espanya	A. 33 cL
25	☆	Estrella Damm Inedit	Ale	Witwier	Blanca	Espanya	A. 75 cL
26	●	San Miguel Selecta	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	A. 33 cL
27	▼	Skol International	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
28	✱	Alhambra Premium Lager	Lager	Pale Lager	Rossa	Espanya	LI. 50 cL
29	⊕	Voll Damm	Lager	Märzenbier	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
30	◇	Bock Damm	Lager	Munich/Bock	Negra	Espanya	LI. 33 cL

31		Weiss Damm	Ale	Weissbier	Rossa	Alemanya	A. 33 cL
32		Mahou negra	Lager	Munich	Negra	Espanya	A. 33 cL
33		Leffe bruin	Ale	Abadia	Negra	Bèlgica	A. 33 cL
34		Leffe blond	Ale	Abadia	Rossa	Bèlgica	A. 33 cL
35		Leffe radieuse	Ale	Abadia	Vermella	Bèlgica	A. 33 cL
36		La Trappe Quadrupel	Ale	Trappist/ Abbey Quadrupel	Rossa	Holanda	A. 33 cL
37		La Trappe Dubbel	Ale	Trappist /doble ferm	Negra	Holanda	A. 33 cL
38		Guinness Draught	Ale	Irish dry stout	Negra	Irlanda	Ll. 44 cL
39		Köstritzer	Lager	Schwarzbier	Negra	Alemanya	A. 33 cL
40		Staropramen	Lager	Pilsener	Rossa	Rep. Txeca	Ll. 50 cL
41		Praga	Lager	Pilsener	Rossa	Rep. Txeca	A. 50 cL
42		Pilsner Urquell	Lager	Pilsener	Rossa	Rep. Txeca	A. 33 cL
43		Marston's Old Empire	Ale	Indian pale ale	Rossa	Anglaterra	A. 50 cL
44		Marston's Strong Pale Ale	Ale	Strong pale ale	Rossa	Anglaterra	A. 50 cL
45		Budejovicky Budvar	Lager	Pilsener	Rossa	Rep. Txeca	A. 33 cL
46		Franziskaner	Ale	Weissbier	Rossa	Alemanya	A. 50 cL
47		Budweiser	Lager	American Adjunt Lager	Rossa	Espanya	Ll. 33 cL
48		Calsberg	Lager	Pilsener	Rossa	Dinamarca	Ll. 33 cL
49		Montseny malta	Ale	Pale ale	Negra	Espanya	A. 33 cL
50		Paulaner	Ale	Weissbier	Rossa	Alemanya	A. 50 cL
51		Cruzcampo Gran Reserva	Lager	Strong Lager	Rossa	Espanya	Ll. 33 cL
52		Cruzcampo Light	Lager	Pilsener Light	Rossa	Espanya	Ll. 33 cL
53		Mahou Light	Lager	Pale Lager Light	Rossa	Espanya	A. 33 cL
54		Sagra	Ale	Red Ale	Vermella	Espanya	A. 33 cL
55		Sagra Bohio	Ale	Barley wine/Triple ferm	Negra	Espanya	A. 33 cL
56		Alhambra negra	Lager	Schwarzbier	Negra	Espanya	Ll. 33 cL
57		Affligem double	Ale	Abadia/ Doble ferm	Negra	Bèlgica	A. 30 cL
58		Grimbergen Double-ambree	Ale	Abadia/ Doble ferm	Negra	França	A. 33 cL
59		Grimbergen Blonde	Ale	Abadia	Rossa	França	A. 33 cL
60		Grimbergen Blanche	Ale	Abadia	Blanca	França	A. 33 cL

61		San Miguel 0,0%	Lager	Sense alcohol	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
62		Free Damm	Lager	Sense alcohol	Rossa	Espanya	LI. 33 cL
63		Mahou sin	Lager	Sense alcohol	Rossa	Espanya	LI. 33 cL

(a) A, ampolla; LI, llauna

