

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE RADICALES LIBRES EN CERVEZA POR RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Lembo Ferrari, Ignacio¹.

Instituto Balseiro, CNEA, Universidad Nacional de Cuyo, S. C. de Bariloche 8400, Argentina.

¹ignacio.lembo@ib.edu.ar

5 de diciembre de 2022

Resumen: Se estudió la capacidad antioxidante de la cerveza a través del monitoreo de la producción de radicales libres en presencia del *spin trap* *N-terc-Butil- α -fenil-nitrona* (PBN), mediante la técnica de espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica (EPR). Para esto se realizaron estudios de envejecimiento oxidativo forzado por temperatura y luz en cervezas marca *Corona* (industrial) y marca *Berlina* (artesanal). Utilizando un modelo de interacción Zeeman e hiperfina se describieron satisfactoriamente los espectros EPR obtenidos para los distintos experimentos, pudiendo obtener las constantes de interacción en cada caso. Además, a partir del análisis de la evolución temporal de la intensidad de señal EPR, se propuso una curva fenomenológica para explicar el proceso de producción de radicales libres en el tiempo. En el caso de la cerveza *Corona* sometida a oxidación forzada por temperatura se pudo determinar el *lag time* (tiempo en el que todos los antioxidantes en la cerveza son consumidos), mientras que para la *Berlina* sometida al mismo proceso no. Esto indicativo de una mayor presencia de antioxidantes en la cerveza *Corona* frente a la *Berlina*.

Palabras clave: Espectroscopia EPR, *spin trapping*, antioxidantes, cerveza.

1. INTRODUCCIÓN

La exposición de la cerveza al calor, la luz y el oxígeno afecta negativamente su sabor, altera su color, reduce su estabilidad y por lo tanto, el tiempo que puede estar almacenada antes de ser consumida [1]. En general, el oxígeno molecular (O_2) no es reactivo pero cuando es activado por luz o calor y catalizado por cationes metálicos, se transforma en especies muy reactivas como ($\cdot OH$) o ($\cdot OOH$) conocidos como formas activas del oxígeno [2]. Ha sido probado [3], que estos radicales ocupan un rol clave en el envejecimiento oxidativo de la cerveza siendo los responsables de la formación de las especies antes mencionadas que dan lugar al mal sabor de la cerveza.

La cerveza, como muchos alimentos, posee antioxidantes capaces de neutralizar los radicales libres demorando la oxidación de los alimentos. Se define el *lag time* como el tiempo transcurrido hasta que todos los antioxidantes en la cerveza son consumidos, momento en el cual los radicales libres desencadenan el proceso oxidativo y por lo tanto el envejecimiento de la cerveza [4].

La espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica ampliamente utilizada para determinar el deterioro de los alimentos debido a que permite detectar radicales libres generados en el proceso de degradación de los mismos [5]. No obstante, debido a que el tiempo de vida medio de los radicales es

muy corto, no es posible detectarlos directamente mediante espectroscopia EPR. Para poder extender dicho tiempo de vida medio se utiliza una técnica conocida como *spin trapping*. Esta técnica consiste en añadir una molécula (*spin trap*) a la muestra en estudio, la cual se combina con los radicales libres, formando una especie más estable en el tiempo conocida como aducto. Esto permite la detección y caracterización indirecta de los radicales formados en la muestra [5]. En este trabajo se utilizó como *spin trap* *N-terc-Butil- α -fenil-nitrona* (PBN).

En general, el proceso de oxidación de la cerveza es muy lento a temperatura ambiente para poder ser estudiado. Por lo tanto, en este trabajo, se sometió a muestras de cerveza *Corona* (de producción industrial) y cerveza *Berlina* (de producción artesanal) a procesos de envejecimiento oxidativo forzado por luz y calor, con el objetivo de monitorear la producción de radicales libres utilizando espectroscopia EPR. Se buscó caracterizar las especies radicales generadas en dicho proceso y por otro lado, obtener información acerca de la capacidad antioxidante de la cerveza.

1.1. Mecanismo de producción de radicales libres durante la oxidación de la cerveza

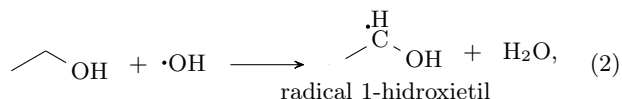
La cerveza, en general, tiene la propiedad de reducir el oxígeno molecular (O_2) a especies activas de oxí-

geno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual una vez formado es estable. Por otro lado, la cerveza tiene trazas considerables de cationes Cu(II) , Fe(II) y Fe(III) los cuales influyen en su sabor [6]. Uchida y Ono [4] probaron experimentalmente que, tanto la presencia de dichos cationes metálicos, como de peróxido de hidrógeno en la cerveza provocan la formación de radicales libres. Estos resultados proveen fuerte evidencia de que dentro de la cerveza ocurren una serie de reacciones donde el oxígeno molecular forma peróxido de hidrógeno, el cuál reacciona con los cationes metálicos para dar lugar a especies radicales. Este último tipo de reacciones son conocidas como reacciones de Fenton [5]

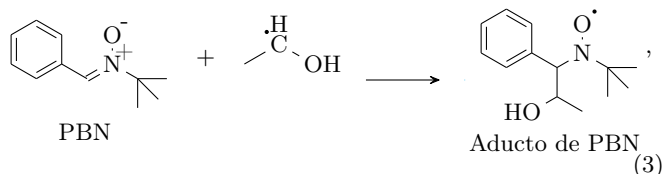


muy lentas a temperatura ambiente.

Andersen y Skibsted [3] han determinado que el radical 1-hidroxietil es el que se encuentra en mayor proporción en muestras de cerveza sometida a procesos oxidativos. En dicho trabajo se propuso la siguiente reacción de formación



donde se destacó el rol clave del etanol en la oxidación de la cerveza. Finalmente, el radical 1-hidroxietil reacciona con el PBN según



dando lugar a una especie estable que es posible medir mediante espectroscopia EPR.

1.2. Espectroscopia por EPR

La espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica (EPR), es la herramienta más poderosa en el campo de la detección de especies paramagnéticas, como son los radicales libres. La idea fundamental de la técnica EPR consiste en desdoblar los niveles de energía electrónicos de una muestra paramagnética mediante un campo magnético estático \mathbf{B}_0 e inducir transiciones entre los niveles energéticos a través de la aplicación de un campo magnético oscilante \mathbf{B}_1 . Para esto, se deben considerar las interacciones entre los espines y el campo magnético estático, y entre los espines electrónicos y nucleares.

1.2.1. Efecto Zeeman

Un electrón es una partícula con carga, espín $S = 1/2$ y momento magnético de espín

$$\boldsymbol{\mu} = -g\mu_B \mathbf{S}, \quad (4)$$

donde g es el factor de Landé asociado al electrón. Cuando se aplica un campo magnético \mathbf{B}_0 a un electrón, se rompe la degeneración de la energía de sus dos posibles estados. Esto se denomina efecto Zeeman. El hamiltoniano asociado a esta interacción es [7]

$$\hat{\mathcal{H}} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} = g\mu_B \hat{\mathbf{S}} \cdot \mathbf{B}_0, \quad (5)$$

y, considerando que el campo solo tiene componente en la dirección \hat{z} , los dos posibles valores para la energía de un electrón desapareado son

$$E_M = Mg\mu_B B_0, \quad (6)$$

donde $M = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$.

Se puede considerar el efecto Zeeman también para espines nucleares pero dado que el magnetón nuclear μ_N es 2000 veces menor a μ_B lo despreciamos en este trabajo.

1.2.2. Interacción Hiperfina

La interacción hiperfina describe el acople entre espines electrónicos ($\hat{\mathbf{S}}$) y nucleares ($\hat{\mathbf{I}}$). El hamiltoniano asociado a dicha interacción es [7]

$$\hat{\mathcal{H}} = A \hat{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{I}} \quad (7)$$

donde A es la constante hiperfina asociada a la interacción entre un dado núcleo atómico y el electrón. Debido a la presencia del campo magnético $\mathbf{B}_0 = B_0 \hat{z}$, se desprecian las componentes no-diagonales de la interacción hiperfina dado que el término de la interacción Zeeman es el dominante en EPR y orienta los momentos magnéticos electrónicos en la dirección \hat{z} . Por lo tanto, se consideran solo las proyecciones de los operadores $\hat{\mathbf{S}}$ e $\hat{\mathbf{I}}$ en la dirección \hat{z} .

Para calcular la energía, dado un estado $|M, m\rangle$, el operador \hat{I}_z solo opera sobre el número cuántico m mientras que \hat{S}_z solo lo hace sobre M , de manera que

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}_z |M, m\rangle &= A \hat{S}_z \hat{I}_z |M, m\rangle = AMm |M, m\rangle \Rightarrow \\ &\Rightarrow E_{M,m} = AMm. \end{aligned} \quad (8)$$

donde $M = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$ y $m = -I, \dots, I$.

1.2.3. Transiciones electrónicas

Para inducir transiciones entre dos niveles de energía desdoblados se debe aplicar un campo magnético perturbativo oscilante $\mathbf{B}_1 = B_1 \cos(2\pi\nu t)\hat{x}$, con frecuencia ν y amplitud $\mathbf{B}_1 \ll \mathbf{B}_0$, de modo tal que la componente magnética sea perpendicular al campo magnético estático[7]. Para este sistema, dicha perturbación, impone las siguientes reglas de selección a las transiciones electrónicas

$$|\Delta M| = 1 \quad \Delta m = 0, \quad (9)$$

y dichas transiciones se darán cuando se satisfaga la condición de resonancia

$$\Delta E_m = g\mu_B B_0 + mA = h\nu, \quad (10)$$

donde ΔE_m es la diferencia, entre dos niveles de energía, correspondientes al mismo número cuántico de espín nuclear m .

1.3. Interacciones relevantes en el aducto de PBN

En el producto de la reacción (3) se puede ver que el aducto de PBN formado posee un oxígeno con un electrón desapareado. Se considera el acople hiperfino entre el espín del electrón con el espín nuclear del átomo de nitrógeno ($I_N = 1$) y con el del núcleo del átomo de hidrógeno más cercano ($I_H = 1/2$). El hamiltoniano que describe dichas interacciones, cuando se aplica un campo magnético estático, es

$$\hat{\mathcal{H}} = g\mu_B \hat{S}_z + A_N \hat{S}_z \hat{I}_{N_z} + A_H \hat{S}_z \hat{I}_{H_z}, \quad (11)$$

Teniendo los valores que puede tomar la energía para este sistema y las reglas de selección $|\Delta M| = 1$ y $\Delta m_N = \Delta m_H = 0$ quedan determinadas las 6 posibles transiciones energéticas del sistema

$$\Delta E_{m_N, m_H} = g\mu_B B_0 + m_N A_N + m_H A_H, \quad (12)$$

donde $m_N = -1, 0, 1$ y $m_H = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$. Un esquema de los niveles de energía y las correspondientes transiciones energéticas se encuentra en la Fig. 1.

Finalmente, de la condición de resonancia para este sistema $\Delta E_{m_N, m_H} = h\nu$, se determinan los 6 campos de resonancia $B_{0,R}$,

$$B_{0,R} = \frac{h\nu}{g\mu_B} - m_N a_N - m_H a_H. \quad (13)$$

donde $a_N = \frac{A_N}{g\mu_B}$ y $a_H = \frac{A_H}{g\mu_B}$. Las constantes a_N , a_H y g del aducto de PBN formado permiten caracterizar los radicales generados en la muestra de cerveza.

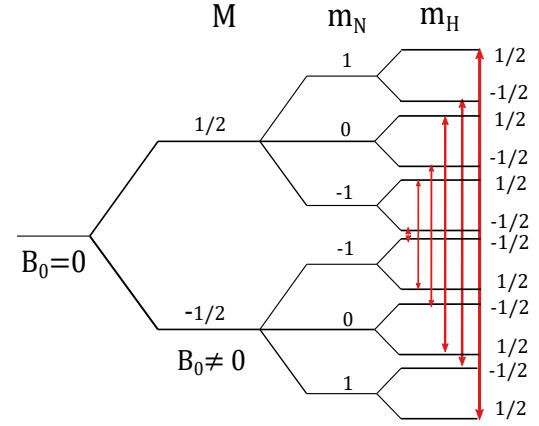


Figura 1: Espectro de energías para el hamiltoniano $\hat{\mathcal{H}} = g\mu_B \hat{S}_z + A_N \hat{S}_z \hat{I}_{N_z} + A_H \hat{S}_z \hat{I}_{H_z}$ que modela las interacciones principales del electrón desapareado en la molécula de PBN. Además, se muestran las posibles transiciones energéticas dadas por las reglas de selección $|\Delta M| = 1$ y $\Delta m = 0$.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. El experimento

Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker ELEXYS II E 500, equipado con una cavidad rectangular de banda X (9.5 GHz) y un controlador de temperatura PID. En la Fig. 2 se esquematizan las principales componentes del equipo.

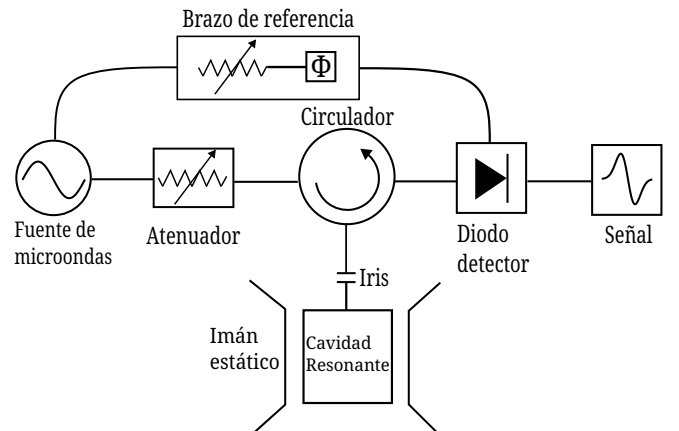


Figura 2: Esquema del espectrómetro EPR utilizado.

En general, los espectrómetros EPR consisten en un electroimán que provee un campo magnético estático, una fuente de microondas, y un par de bobinas de modulación. Las microondas generadas viajan a través de una guía de ondas hacia la cavidad resonante donde se ubica la muestra. En esta cavidad, se producen ondas estacionarias de frecuencia determinada exclusivamente por la geometría de la misma. Además, tiene la propiedad de que en el centro de la misma el campo mag-

nético es máximo. La cavidad se ubica de tal manera que el campo magnético en el centro sea perpendicular al campo magnético producido por el electroimán. La presencia de un iris en la entrada de la cavidad permite acoplar impedancias entre la guía de ondas y la cavidad, de manera que se trabajó siempre en la condición de acople crítico. Por último, las microondas, son reflejadas por la cavidad y redirigidas mediante el circulator hacia un diodo detector que varía su corriente según la intensidad de la señal recibida. Para asegurar que el diodo trabaje en la zona lineal se tiene un brazo de referencia, el cual se calibra para obtener una corriente en el rango de los 200 μA .

2.2. Medición del espectro EPR

La medición de un espectro de absorción consistió en variar el campo magnético \mathbf{B}_0 del electroimán hasta que se dé la condición de resonancia (Ec. 13), de modo que se produzca una absorción de energía. Dicha absorción se traduce como un cambio en la señal del detector produciendo una curva de absorción tipo gaussiana centrada en el campo de resonancia.

Debido a que la señal EPR obtenida es muy pequeña (comparable al ruido), para poder efectivamente medir el espectro, se utiliza la técnica de detección Fase-Sensible. Esta consiste en modular sinusoidalmente el campo magnético \mathbf{B}_0 a una frecuencia de 100 kHz mediante un par de bobinas de modulación, y utilizar un Lock-In. El Lock-In recibe como entrada la señal modulada y como referencia la onda sinusoidal de 100 kHz y filtra toda componente que no tenga la misma frecuencia, lo cual mejora la sensibilidad del equipo y elimina gran parte del ruido de línea. La amplitud de modulación debe ser pequeña en comparación con el ancho del pico para que la señal detectada sea aproximadamente proporcional a la pendiente de la curva de absorción como se ilustra en la Fig. 3. Se puede ver que la señal obtenida es la derivada primera de la curva de absorción (ver panel superior Fig 3).

De esta manera, para una especie radical que forma un aducto con PBN, se obtiene el llamado espectro EPR con 6 líneas centradas en los campos de resonancia dados por la Ec. (13) que corresponden a las derivadas de los curvas de absorción.

2.3. El experimento

Se desgasificó la muestra de cerveza en una batea de ultrasonido, y luego, se disolvieron 0.0088 g de PBN en 1 ml de cerveza, cantidad suficiente de *spin trap* que asegura que no limite la reacción. Posteriormente, se

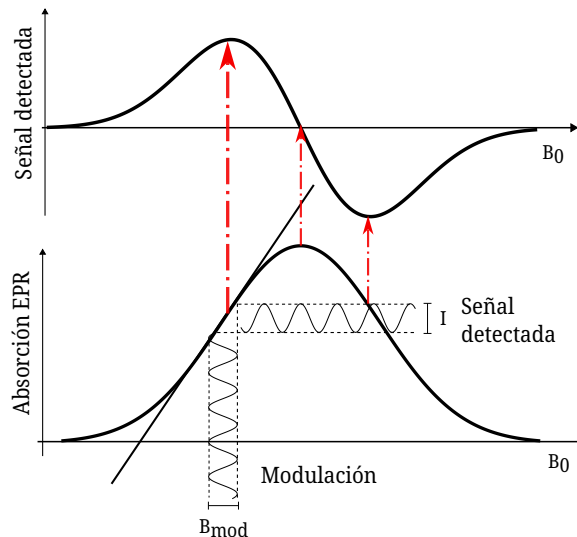


Figura 3: Efecto del campo de modulación en la curva de absorción (curva inferior) sobre la señal detectada (curva superior). La intensidad de la señal de salida es proporcional a la derivada de la curva de absorción.

introdujo la muestra de cerveza con PBN en un capilar de cuarzo¹. Los parámetros de medición más relevantes fueron: Potencia de la microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 0.8 G; frecuencia de modulación, 100 kHz y número de espectros promediados por medición, 3.

Los experimentos de oxidación forzada por calor consistieron en medir espectros de absorción de la muestra de cerveza en función del tiempo de exposición a alta temperatura. Para esto, la cavidad contaba con un criostato conectado a un termo con LN_2 y regulado por un controlador PID, mediante el cual, se estableció una temperatura en un rango² de $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$.

Por otro lado, para los experimentos de oxidación forzada por luz, se midieron los espectros de absorción de la muestra en función del tiempo de irradiación con luz UV-B a temperatura ambiente.

Para caracterizar el aducto de PBN formado en cada muestra, se tomó el espectro mejor definido y se lo ajustó con la superposición de 6 curvas correspondientes a derivadas de gaussianas, cada una centrada en un campo de resonancia distinto. Se obtuvieron como parámetros del ajuste las constantes a_N , a_H y g , la intensidad y el ancho de línea. Luego, para analizar la evolución temporal de la señal a cada tiempo, se dejaron fijos las constantes a_N , a_H y g y se ajustó únicamente la intensidad como parámetro libre ya que el ancho de línea se vio que era constante. Finalmente,

¹Se utiliza este material debido a que no presenta comportamiento paramagnético por lo que no interfiere en la medición

²A 60°C el PBN no se llega a degradar (este se degrada a 70°C) y se acelera lo máximo posible la reacción

se graficó el valor de intensidad en función para cada tiempo para estudiar la evolución temporal de los radicales libres.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Oxidación aeróbica inducida por temperatura

La Fig. 4 muestra un resultado típico del espectro de especies radicales formadas al someter una muestra de cerveza a envejecimiento oxidativo a forzado a 60 °C.

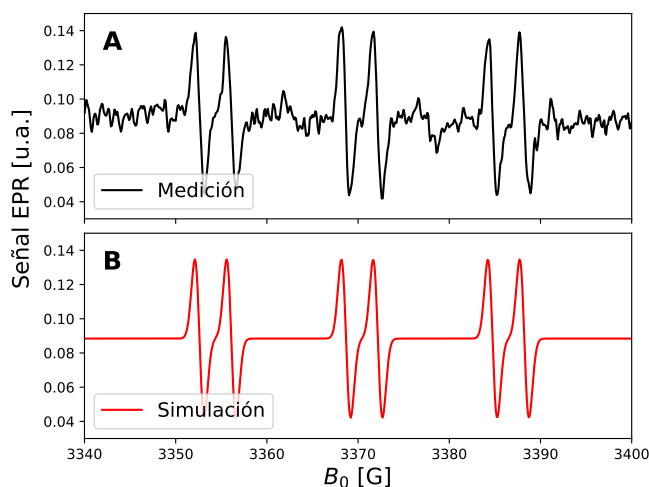


Figura 4: Espectro EPR para la cerveza *Corona* expuesta a 165 minutos de oxidación forzada por temperatura. El panel superior corresponde a los datos experimentales y el panel inferior a la curva simulada a partir del ajuste.

Se detectó una única especie predominante con seis líneas. Este espectro pudo ajustarse satisfactoriamente considerando las interacciones Zeeman e hiperfina del electrón desapareado con los núcleos vecinos de los átomos de Nitrógeno e Hidrógeno (ver sección (1.3)). A partir de dicho ajuste (Fig. 4B) se obtuvieron constantes de acoplamiento hiperfino $a_N = (16.1 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.5 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$, características del aducto de PBN con el radical 1-hidroxietil. Este resultado es consistente con lo mencionado en la sección (1.1) donde se argumentó que el radical 1-hidroxietil es el que se encuentra en mayor proporción en muestras de cerveza sometida a procesos oxidativos.

Además, para la cerveza *Berlina* se obtuvieron espectros muy similares y las mismas constantes hiperfinas que para la *Corona*. Una notable diferencia fue la intensidad en la señal obtenida, siendo mucho mayor para la cerveza *Berlina* indicando la presencia de una mayor cantidad de radicales libres.

En la Fig. 5 se ilustra la evolución de la intensidad de la señal en función del tiempo de exposición a alta temperatura para la cerveza *Corona*. Se observa como, inicialmente la tasa de formación de radicales es lenta, y una vez transcurrido el *lag time* esta aumenta considerablemente. Este cambio en la tasa de producción de radicales se puede atribuir a la presencia de antioxidantes en la cerveza, los cuales durante el *lag time* neutralizan los radicales formados [4].

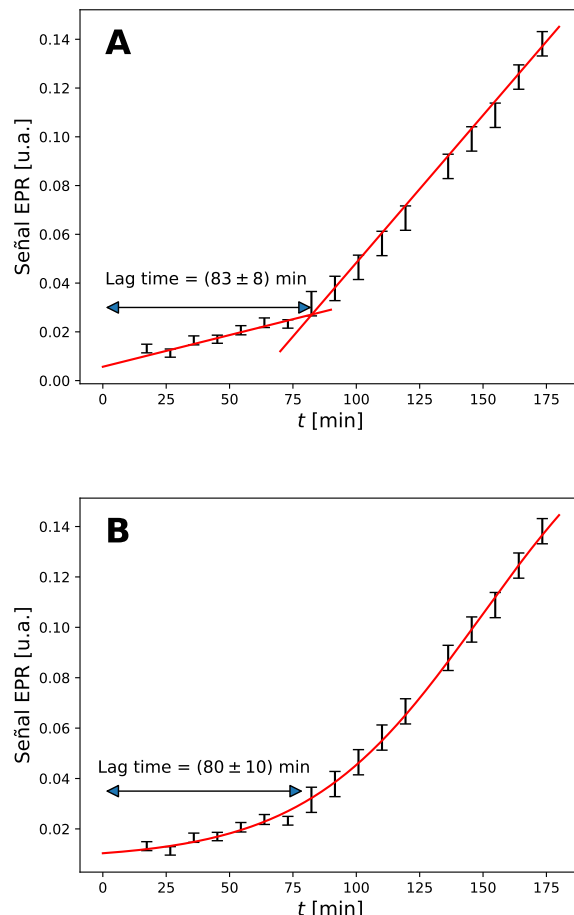


Figura 5: Intensidad de señal EPR en función del tiempo para la cerveza *Corona* sometida a oxidación forzada por temperatura. En (A) se utilizó el criterio de las dos rectas para la determinación del *lag time* mientras que en (B) el ajuste con una curva sigmoidea de Boltzmann.

Para la determinación del *lag time*, a partir de los valores experimentales de intensidad de la señal del aducto para cada tiempo, se utilizaron dos criterios [8]: El primero consistió en identificar en la curva un punto de inflexión y ajustar con una recta los valores a cada lado de dicho punto, luego la intersección de las rectas es el *lag time*. Para el segundo, se ajustaron los

datos con la función sigmoidea de Boltzmann,

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \exp \frac{x_0 - x}{dx}}, \quad (14)$$

y luego se calculó el *lag time* = $x_0 - 2dx$ [9].

Se puede ver en las Figs. 5A y 5B que ambos criterios arrojan *lag times* que no discrepan y con error relativo similar, lo cual indica que ambos criterios son consistentes. Se obtuvieron *lag times* de (83 ± 8) min y (80 ± 10) min para el criterio de las rectas y de la sigmoidea de Boltzmann respectivamente. Una ventaja del ajuste con la función sigmoidea es que no depende de qué conjuntos de puntos se tomen para realizar los dos ajustes lineales, por lo que es un método menos arbitrario para determinar el *lag time*.

Para la cerveza *Berlina*, la curva de intensidad de aducto de PBN en función del tiempo de exposición a temperatura (ver Fig. 6) no muestra ningún punto de inflexión donde aumente la pendiente, si no más bien la curva tiende a saturar y de esta forma no es posible definir un *lag time*. Este fenómeno ha sido observado en diversos estudios anteriores para cervezas rojas, negras y lager añejas [10] y para cervezas artesanales [11]. Por otro lado, la señal obtenida para la cerveza *Berlina* es significativamente mayor que la obtenida para la *Corona*, y dado que la señal es proporcional al número de espines presentes en la muestra de cerveza [5] se tiene que se produjo una mayor cantidad de radicales libres en la cerveza artesanal frente a la industrial. Todo esto es indicativo de que este tipo de cervezas poseen menos antioxidantes y por lo tanto su consumo debe ser más rápido que el de una cerveza industrial como la *Corona*.

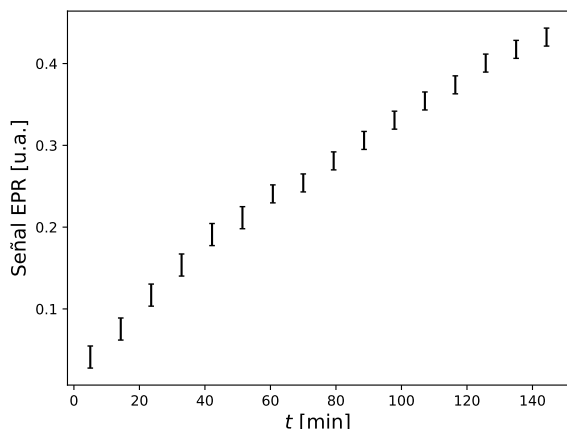


Figura 6: Intensidad de señal EPR en función del tiempo para la cerveza *Berlina* sometida a oxidación forzada por temperatura. No se observó *lag time*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se propone, para caracterizar mejor el proceso de formación de radicales libres, una curva fenomenológica tipo sigmoideal (ver Fig. 7) de intensidad de señal en función del tiempo con tres regiones. La región I representa la neutralización de los radicales debido a la presencia de antioxidantes. La región II, que comienza una vez transcurrido el *lag time*, por lo que la presencia de antioxidantes es mucho menor y los radicales que se producen son atrapados por el *spin trap* dando lugar a un aumento de la señal. Y por último, una región III de saturación, donde se entiende que la reacción llega a un estado estacionario en el que la tasa de formación de aductos de PBN se equilibra con la tasa de decaimiento de aductos ya formados que se recombinan perdiendo la propiedad paramagnética. Se destaca que lo observado para la cerveza *Corona* correspondería a la región I y II, mientras que para la cerveza *Berlina* a la región II y III, sugiriendo que no hay *lag time* (o es muy bajo) para la cerveza artesanal.

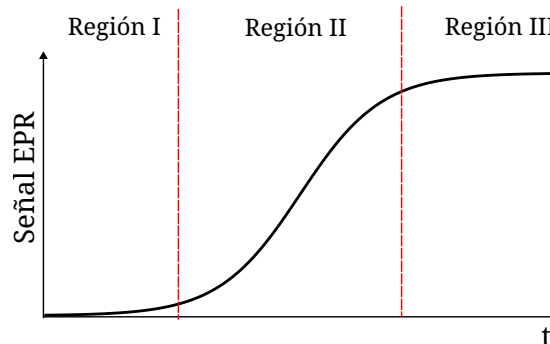


Figura 7: Curva fenomenológica tipo sigmoideal propuesta para explicar las 3 etapas observadas de formación de radicales libres. Región I: representa la neutralización de los radicales debido a los antioxidantes; Región II: Aumento de la tasa de producción de radicales debido al agotamiento de los antioxidantes; Región III: Equilibrio entre la tasa formación de aductos de PBN y su tasa de decaimiento.

3.2. Oxidación inducida por luz UV

Tanto para la cerveza *Corona* como para la *Berlina*, expuestas a oxidación forzada por luz UV-B, se obtuvieron espectros como el que se muestra en la Fig. 8. Se detectó la presencia de dos especies de radicales, a diferencia de las cervezas incubadas a 60°C donde se observó solo una. Por lo tanto, en este caso se propuso ajustar el espectro suponiendo la presencia de dos especies (se los llamó radicales 1 y 2) con interacciones Zeeman e hiperfina descritas en la sección (1.3) pero distintas constantes de acoplamiento hiperfino y factor-g. El ajuste resultó satisfacto-

rio dando lugar a las siguientes constantes para ambas cervezas: Para el radical 1, $a_N = (16.2 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.4 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$; y para el radical 2, $a_N = (15.4 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.6 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$. Los espectros simulados de ambos radicales se ilustran en la Fig. 8B.

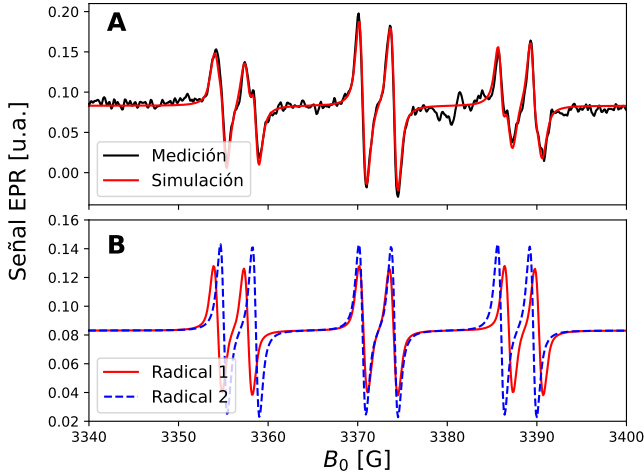


Figura 8: Espectro EPR para la cerveza *Corona* expuesta a 90 minutos de oxidación forzada por luz UV-B. El panel superior corresponde a los datos experimentales ajustados considerando la presencia de dos especies radicales y el panel inferior muestra los espectros EPR para cada radical por separado. Se puede ver que las constantes de interacción para cada radical son diferentes ya que las líneas de los espectros no coinciden.

En la Fig. 9 se aprecia el rápido crecimiento de la señal de cada radical y la diferencia entre las evoluciones temporales de los mismos, resultado que puede ser importante para entender el mecanismo de reacción que ocurre en el proceso de oxidación forzada por luz UV-B.

Para dar una posible explicación de la rápida oxidación debido a exposición de la cerveza a luz UV-B, se argumentó que la radiación rompe los enlaces de moléculas orgánicas presentes en la cerveza produciendo radicales libres, los cuales forman aductos con el PBN y son detectados en la medición. Diversos trabajos [1], [12] estudian este tipo de reacciones para las especies orgánicas presentes en la cerveza y las caracterizan mediante el uso de múltiples *spin traps*. En este experimento no se realizaron los estudios suficientes para poder caracterizar los radicales observados. Por otro lado, no fue posible determinar un *lag time* para los radicales formados debido a que no se contaba con una cantidad suficiente de puntos. Sería interesante estudiar a futuro la evolución temporal de las especies de radicales libres formados midiendo durante más tiem-

po y buscar un argumento que explique el cruce de las curvas en la Fig. 9A.

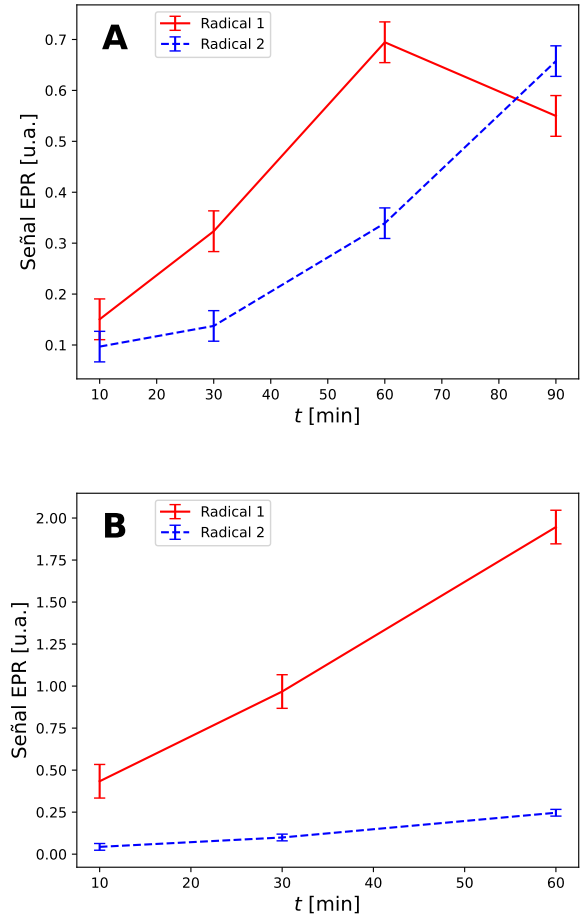


Figura 9: Intensidad de señal EPR de cada radical producido en función del tiempo de exposición a la luz UV-B para: (A) Cerveza *Corona*; (B) Cerveza *Berlina*.

4. CONCLUSIONES

Se investigó acerca de la capacidad antioxidante de la cerveza mediante el monitoreo de la producción de radicales libres utilizando espectroscopia EPR. Para esto se sometió a muestras de cerveza *Corona* (industrial) y *Berlina* (artesanal) a envejecimiento oxidativo forzado por temperatura y luz. Debido al corto tiempo de vida de los radicales producidos en la cerveza se implementó la técnica de *spin trapping*, utilizando *N-terc-Butil- α -fenil-nitrona* (PBN) como *spin trap*.

En primer lugar, en el estudio de oxidación forzada a 60°C para ambas cervezas, se obtuvo una especie radical predominante, que en base a estudios realizados previamente [3], [4] se identificó como el radical 1-hidroxietil. Las constantes de interacción para el

aducto PBN-1-hidroxietil fueron: $a_N = (16.1 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.5 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$, comparables con las obtenidas en experimentos anteriores [11].

Para la cerveza *Corona*, se aplicaron dos criterios para determinar el *lag time*: Uno consistió en el ajuste de los valores de intensidad de señal en función del tiempo con dos rectas y el otro en el ajuste con una función sigmoidea de Boltzmann. Se obtuvieron *lag times* de (83 ± 8) min y (80 ± 10) min respectivamente, mostrando que ambos criterios son compatibles. Por otra parte, para la cerveza *Berlina* no se pudo determinar un *lag time* indicando que esta posee menos antioxidantes que la *Corona*.

En base a estos resultados se propuso, para caracterizar el proceso de formación de radicales libres, una curva de fenomenológica tipo sigmoidal donde se esquematizan las 3 etapas de producción de radicales libres en cerveza. La primera, donde los antioxidantes neutralizan todos los radicales; la segunda, donde aumenta notablemente la tasa de producción de espines debido al agotamiento de antioxidantes; y la tercera, donde se equilibra la reacción debido a que se equipara la tasa de formación de aductos de PBN con la tasa de decaimiento de los mismos.

Por otro lado, en cuando al proceso de oxidación inducida por luz UV, se detectó la presencia de dos especies radicales de las cuales se determinaron las constantes de interacción: $a_N = (16.2 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.4 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$ para un radical; y $a_N = (15.4 \pm 0.1)$ G, $a_H = (3.6 \pm 0.1)$ G y $g = (2.0030 \pm 0.0001)$ para el otro. Se argumentó que la radiación rompe enlaces de moléculas orgánicas presentes en la cerveza dando lugar a radicales libres, los cuales forman aductos con el PBN. No obstante, no se contó con la información necesaria para caracterizar dichos radicales.

Debido a la falta de puntos para cada radical obtenido, no se pudo determinar un *lag time* para los mismos, pero se propone como experimento a futuro estudiar la evolución temporal de los radicales libres formados por oxidación forzada con luz UV tomando datos durante más tiempo. Además, mediante el uso de otras moléculas de *spin trap* se podrían caracterizar las especies radicales formadas con el objetivo de explicar el mecanismo de reacción que ocurre en este proceso.

El modelo de interacción Zeeman e hiperfina para el aducto de PBN formado resultó ser adecuado para describir los espectros observados. Los resultados obtenidos muestran la capacidad de la técnica de es-

pectroscopia por EPR + *spin trapping* para obtener información sobre la capacidad antioxidante de la cerveza y para caracterizar las especies radicales formadas en el proceso de oxidación de la misma.

REFERENCIAS

- [1] Huvaere, K.; Andersen, M. L. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Elsevier: **2009**, 1043–1053.
- [2] Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Ramarathnam, N.; Kawakishi, S.; Kamada, K. Detection of Free Radicals in Beer Oxidation. *Journal of Food Science* **1988**, *53*, 885–888.
- [3] Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. Electron Spin Resonance Spin Trapping Identification of Radicals Formed during Aerobic Forced Aging of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1272–1275.
- [4] Uchida, M.; Ono, M. Improvement for Oxidative Flavor Stability of Beer—Role of OH-Radical in Beer Oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **1996**, *54*, 198–204.
- [5] Schmallegger, M.; Gescheidt, G. Antioxidant Activity of Beer: An EPR Experiment for an Undergraduate Physical-Chemistry Laboratory. *Journal of Chemical Education* **2018**, *95*, 2013–2016.
- [6] Kaneda, H.; Kano, Y.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Kamada, K. The Role of Free Radicals in Beer Oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **1989**, *47*, 49–53.
- [7] Weil, J. A.; Bolton, J. R., Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications, Second edition; A John Wiley & Sons, Inc., publication; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, **2007**; 664 pp.
- [8] Barr, D.; Heiss, A.; Kamlowski, A.; Maier, D.; Erstling, J.; Meling, H. Note Shelf Life Analysis of Beer. 4.
- [9] Ziaunys, M.; Sakalauskas, A.; Mikalauskaite, K.; Smirnovas, V. Polymorphism of Alpha-Synuclein Amyloid Fibrils Depends on Ionic Strength and Protein Concentration. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 12382.
- [10] Porcu, M. C.; Fadda, A.; Sanna, D. Lag Time Determinations in Beer Samples. Influence of Alcohol and PBN Concentration in EPR Spin Trapping Experiments. *Oxygen* **2022**, *2*, 605–615.

- [11] Palumbo, S. Tiempo de góndola y envejecimiento en cervezas artesanales e industriales por oxidación con radicales libres, un enfoque desde la resonancia paramagnética. 9.
 - [12] Berton, J. K. E. T.; Verbeke, Y.; Van Durme, B.; Huvaere, K. Radical Intermediates in the Degradation of Hop Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69*, 9642–9653.
-