

Parole chiave: stabilità ossidativa, birra, ESR, antiossidanti, spin trapping

Radicali intrappolati

La tecnica dello *spin trapping* accoppiata con la spettroscopia di Risonanza di Spin Elettronico (ESR or EPR) è stata proposta come metodo per la previsione della *shelf life* delle birre, basata sulla determinazione del *lag time* [1]. Le specie radicaliche prodotte durante il riscaldamento della birra a 60 °C (o ad altri valori di temperatura), che non potrebbero essere rivelate a causa della loro elevata reattività, sono intrappolate dal PBN (N-t-butyl-α-fenilnitron) formando addotti relativamente stabili (vedi Figura 1).

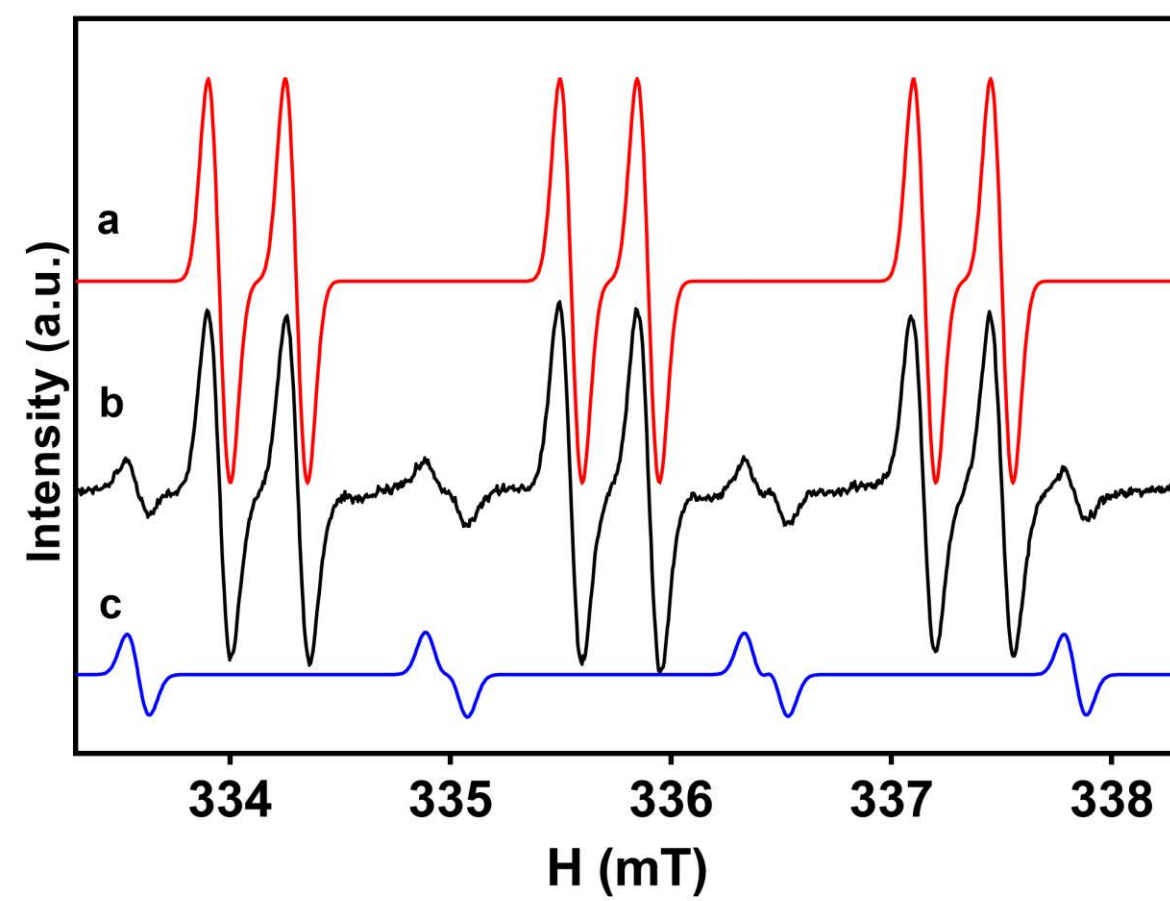


Figura 1 Spettri sperimentali (b), tratto nero) e simulati (a,c), tratti rosso e blu) dell'addotto PBN-radical 1-idrossietile (a) e radical *tert*-butil aminossile (c) rivelati durante il trattamento termico dei campioni di birra a 60 °C. Lo spettro sperimentale è stato ottenuto dopo 151 min di trattamento termico a 60 °C su un campione di birra strong lager con PBN 200 mM e il 13% di alcool.

Effetto della temperatura

Per la determinazione del *lag time*, un'altra variabile che è possibile considerare è la temperatura alla quale vengono riscaldati i campioni analizzati: anche variando questo parametro, la determinazione del *lag-time* non sempre è possibile. La forma delle curve intensità dell'addotto PBN-radical 1-idrossietile in funzione del tempo cambia, con la comparsa di un massimo di intensità spostato verso intervalli di tempo di tempo più brevi all'aumentare della temperatura (vedi Figura 3).

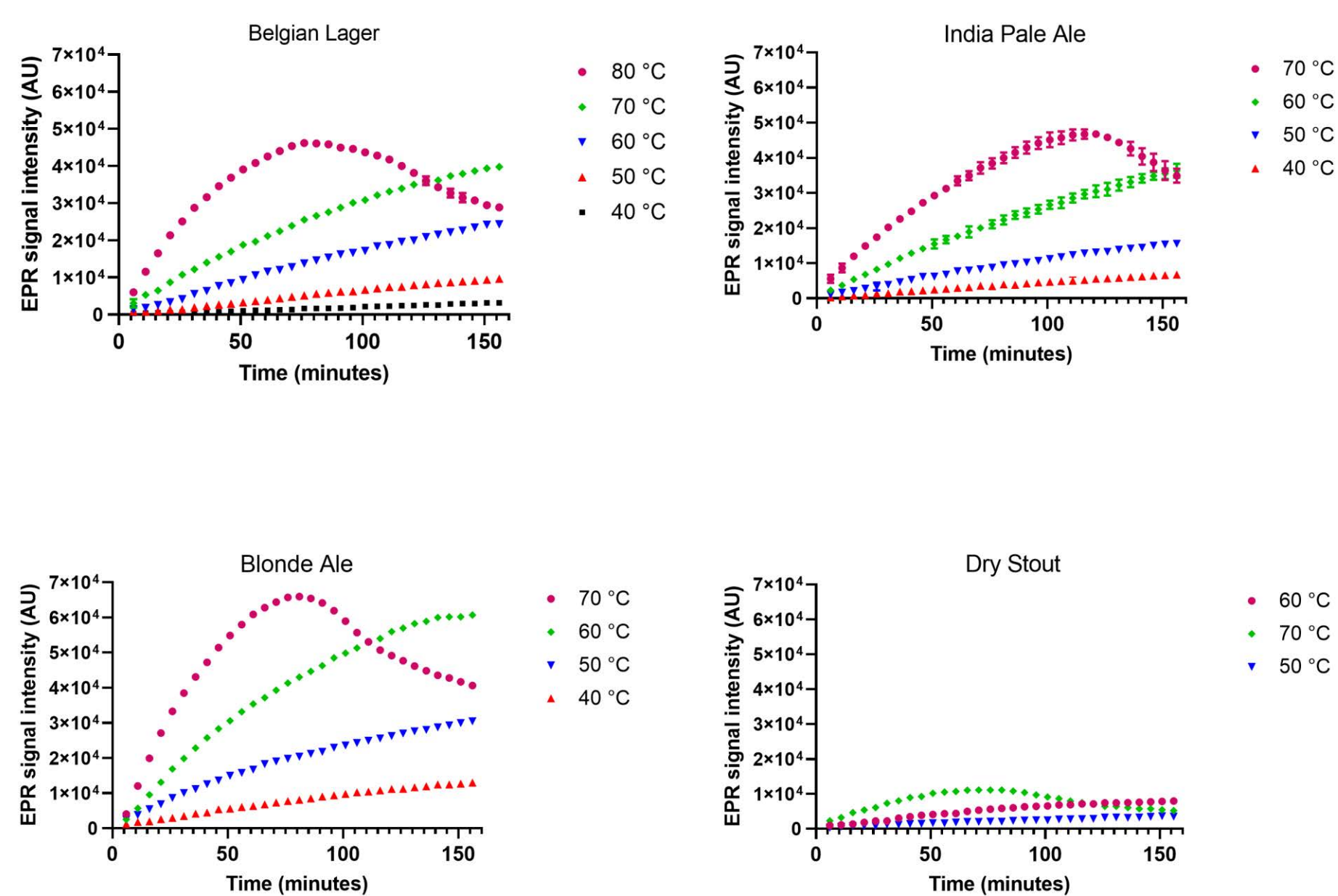


Figura 3 Curve cinetiche dell'intensità del segnale dell'addotto del PBN in funzione del tempo per campioni di birra Belgian Lager, India Pale Ale, Blonde Ale e Dry Stout sottoposte a trattamento termico a: 40, 50, 60, 70, and 80 °C.

Relazione tra parametri ESR e spettrofotometrici

Per la determinazione della stabilità ossidativa della birra, che è in relazione diretta con la sua *shelf life*, sono stati utilizzati parametri differenti dal *lag time*, cioè l'intensità del segnale dell'addotto dopo 150 min (T_{150}) e l'area sotto la curva (AUC) intensità dei segnali degli addotti in funzione del tempo. Poiché la disponibilità di uno spettrometro ESR è preclusa alla maggior parte dei birrifici, la stabilità ossidativa delle birre determinata mediante spettroscopia ESR è stata efficacemente messa in relazione con altri parametri analitici, quali: i) la capacità antiossidante misurata con il saggio del DPPH, ii) il contenuto di polifenoli totali, iii) l'indice tiobarbiturico, (vedi Figura 5). La metodologia proposta può essere usata per altre matrici alimentari per la determinazione della loro stabilità ossidativa.

Riferimenti bibliografici

- [1] D. Barr et al (2001) Shelf life analysis of beer using an automated lag-time EPR system. *Spectroscopy* 16 (12), 16-19, 2001.
- [2] M.C. Porcu, A. Fadda, D. Sanna D. Lag time determinations in beer samples. Influence of alcohol and PBN concentration in EPR spin trapping experiments. *Oxygen* 2(4), 605–615, 2022.
- [3] M.C. Porcu, A. Fadda, D. Sanna, Relationship among EPR oxidative stability and spectrophotometric parameters connected to antioxidant activity in beer samples *Eur. Food Res. & Technol.*, 2024, doi: 10.1007/s00217-024-04525-9

Determinazione del lag time

La variazione dell'intensità del segnale degli addotti in funzione del tempo permette la determinazione del *lag time*, cioè del tempo al quale si ha un evidente incremento dell'intensità del segnale (vedi Figura 2). La determinazione del *lag time* non sempre è possibile, sia variando la concentrazione di PBN e/o il contenuto di alcool dei campioni sottoposti a riscaldamento.

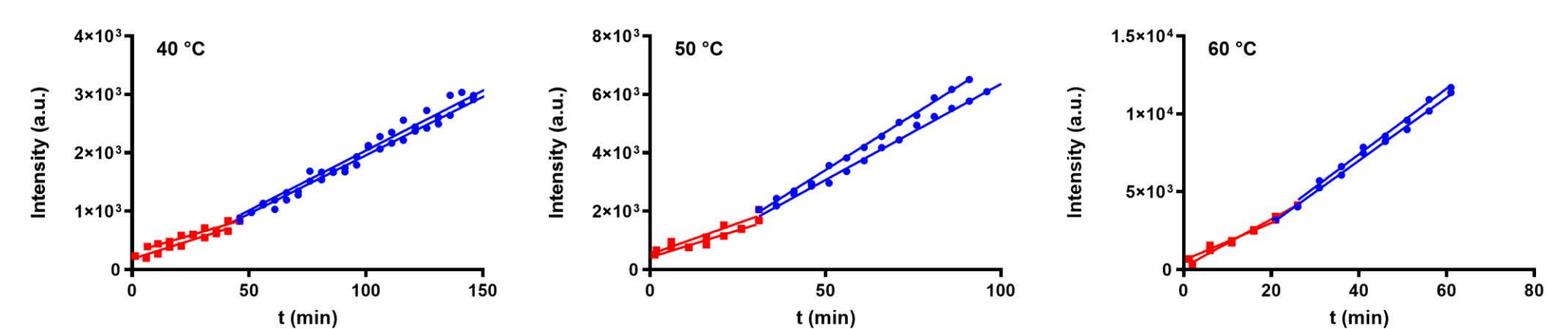


Figura 2 Procedura mediante intersezione di due rette usata per la determinazione del *lag time* di campioni di birra Belgian Lager sottoposti a trattamento termico a: 40, 50, e 60 °C. I valori di *lag time* ottenuti sono: 33.2 ± 1.8 min a 40 °C, 24.6 ± 2.4 min a 50 °C, e 20.7 ± 0.1 min a 60 °C.

Attività antiossidante delle birre

Non è stata trovata nessuna correlazione tra i valori di HRSC e quelli di TPC o RSA, dimostrando che, anche se questi tre parametri sono in relazione con l'attività antiossidante delle birre, essi misurano differenti sfumature della stessa proprietà (vedi Figura 4).

La HRSC misura la capacità dei campioni di birra di estinguere i radicali idrossile prodotti mediante la reazione di Fenton e intrappolati dal DMPO. Quindi può essere considerato un altro saggio per la misura della attività antiossidante delle birre. In questo caso il DMPO è stato usato per intrappolare i radicali idrossile generati *in situ* mediante la reazione di Fenton, mentre in altri casi è stato usato al posto del PBN per intrappolare i radicali generati durante gli esperimenti di ossidazione forzata dei campioni di birra sottoposti a riscaldamento.

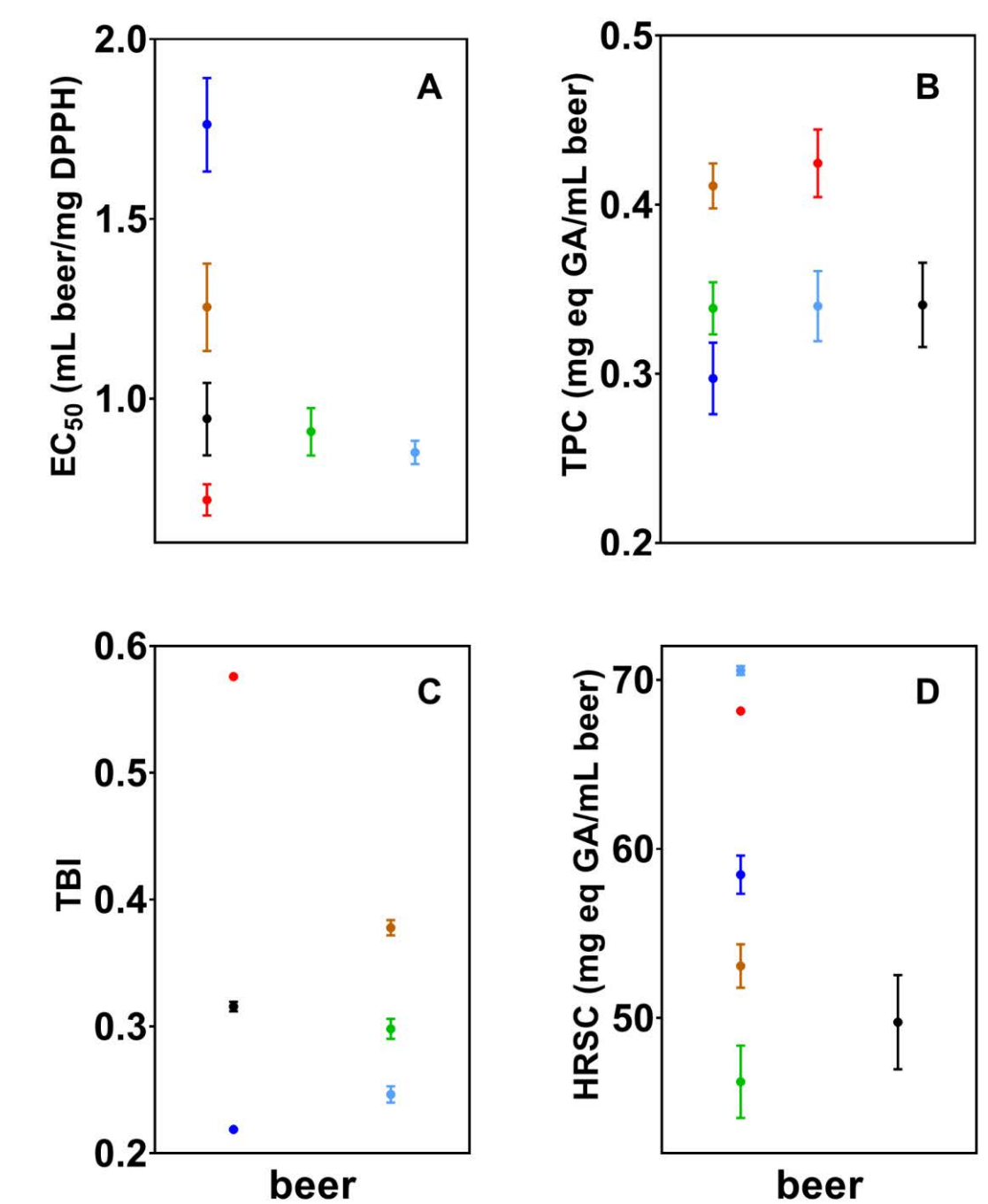


Figura 4 Confronto dei: A) valori di EC_{50} del saggio del DPPH ottenuti per le birre esaminate nei riferimenti [2] e [3]; B) valori di contenuto di polifenoli totali (TPC); C) valori di indice tiobarbiturico (TBI); e D) valori di capacità di estinguere i radicali idrossile (HRSC) misurati per le birre: Pilsner (●); Strong Lager (●); Blonde Ale (●); Belgian Lager (●); India Pale Ale (●); Dry Stout (●).

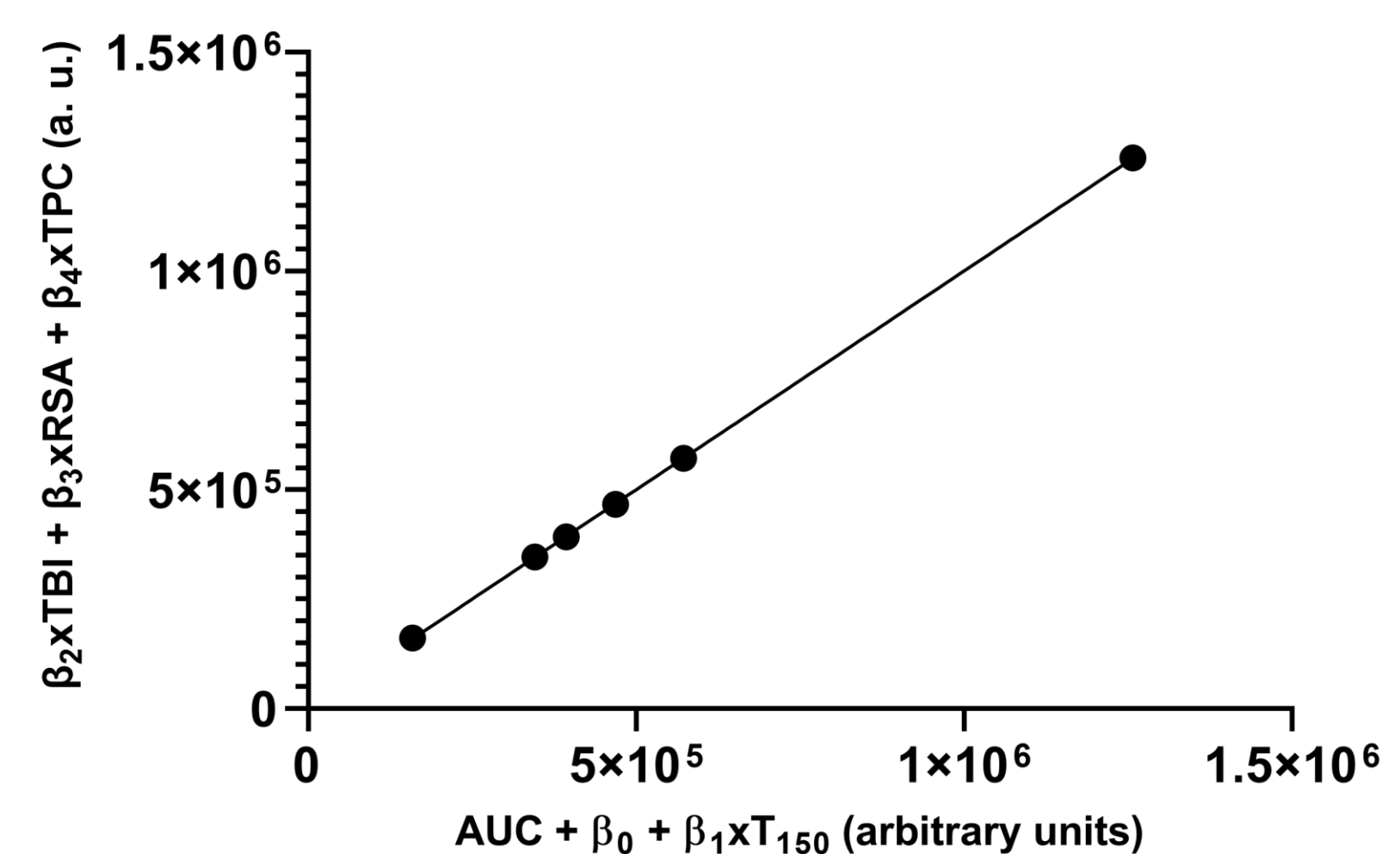


Figura 5 Confronto tra una combinazione di parametri sperimentali ottenuti mediante ESR (AUC e T_{150}) e i loro valori calcolati con una combinazione di parametri spettrofotometrici and (RSA, TPC e TBI). Il fitting ha $R^2 = 1$.

$$AUC + \beta_0 + \beta_1 \times T_{150} = \beta_2 \times TBI + \beta_3 \times RSA + \beta_4 \times TPC$$

dove $\beta_0 = 443236$; $\beta_1 = -84.44$; $\beta_2 = 4181025$; $\beta_3 = 187159$; $\beta_4 = -3023979$

