

**Universidad de Valladolid**

---

**Facultad de Medicina.**

**NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**CURSO 2020/2021**

**EFECTO DEL LÚPULO COMO  
ANTIOXIDANTE NATURAL EN MANZANAS  
REINETA Y CARNE DE CORDERO**

**Autora: Raquel García Reguera**

**Tutora: D<sup>a</sup>. Irma Caro Canales**

**Tutor: D. Javier Mateo Oyagüe**

## Resumen

La oxidación enzimática y la autooxidación lipídica condicionan la vida útil de los alimentos de origen vegetal y animal, respectivamente. Para retrasar la oxidación sin recurrir a los aditivos, se está investigando en la industria alimentaria el uso de ingredientes ricos en antioxidantes naturales. En este estudio se ha evaluado el efecto de infusiones de lúpulo, que contiene sustancias antioxidantes, sobre el pardeamiento enzimático de manzana y la autooxidación de carne cocinada. Se sumergieron rodajas de manzana en infusiones de lúpulo de variedad Cascade y Nugget a concentraciones de 1 y 2 g/l adicionadas con ácido cítrico al 0,5%, así como en una solución acuosa de cítrico al 0,5% (Control), y se evaluó el pardeamiento de la manzana refrigerada. También se marinó carne en las infusiones de lúpulo antes mencionadas adicionadas con 2% de sal, en una solución acuosa con 2% sal (Control negativo) y en otra con 2% de sal más 0,5% de ácido ascórbico (Control positivo), se cocinó y observó el cambio en las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico tras 6 días de refrigeración. La infusión de lúpulo de variedad cascade redujo el pardeamiento de la manzana durante la primera hora de almacenamiento y no frenó la oxidación lipídica de la carne.

**Palabras clave:** lúpulo, pardeamiento enzimático, antioxidantes naturales, humulonas, oxidación lipídica.

## Abstract

Enzymatic oxidation and lipid oxidation condition the shelf life of foods of plant and animal origin respectively. The food industry is currently studying the use of ingredients rich in natural antioxidants so as to delay oxidation without recurring to additives. This study evaluates the effect of hop infusions -which contain antioxidant substances- on enzymatic browning of apples as well as on self-oxidation of cooked meat. Slices of apple were immersed in Cascade and Nugget variety hop infusions with concentrations of 1 and 2 g/L added with citric acid at 0.5% as well as in a citric 0.5% aqueous solution (control). Then, browning of the refrigerated apple was studied. The study also involved marinating the meat in both hop infusions above mentioned, added with 2% of salt: one being an aqueous solution with 2% salt (negative control) and other with 2% salt plus 0.5% of ascorbic acid (positive control). The following step involved cooking the meat and observing the changes in the reactive substances towards the thiobarbituric acid after 6 days of refrigeration. Overall, the Cascade variety hop infusion reduced the apple browning during the first hour of storing and did not stop lipid oxidation of meat.

**Keywords:** hop, enzymatic browning, natural antioxidants, humulone, lipid oxidation

## ÍNDICE

1. Introducción .....	3
1.1. Alteración en la calidad frutas y vegetales .....	3
1.2. Estrategias empleadas para evitar el pardeamiento en vegetales y frutas .....	4
1.3. Alteración en la calidad de la carne .....	6
1.4. El uso de antioxidantes en carne .....	7
1.5. El lúpulo como ingrediente antioxidante .....	8
2. Objetivos .....	10
3. Materiales y métodos .....	10
3.1. Plan del experimento, infusión de lúpulo y muestras de análisis .....	12
3.2. Experimento 1. Pardeamiento enzimático: preparación de las muestras y muestreo .....	12
3.3. Experimento 2. Autoxidación lipídica: preparación de las muestras y muestreo..	12
3.4. Estudio de la capacidad antioxidante .....	13
3.5. Análisis estadístico .....	15
4. Resultados y discusión .....	15
4.1. Capacidad antioxidante del lúpulo frente al DPPH .....	15
4.2. Efecto del lúpulo sobre el pardeamiento enzimático .....	16
4.3. Efecto del lúpulo sobre la oxidación lipídica .....	21
5. Conclusión .....	23
6. Referencias bibliográficas .....	24

## 1. Introducción

Los alimentos perecederos son aquellos que normalmente se alteran, deterioran y pueden causar enfermedades debido al crecimiento de microorganismos patógenos, si no son mantenidos en refrigeración a 4°C o a temperaturas inferiores. Entre los alimentos perecederos encontramos las frutas y verduras, productos lácteos, la carne, los pescados (1). Cuando estos productos no están sujetos a procesos de conservación, es muy posible que en periodos cortos de tiempo presenten cambios que acorten su vida útil, debido a la propia actividad metabólica de los alimentos y la acción de los microorganismos.

La refrigeración es considerada como una de las medidas más importantes para alargar la vida útil de los alimentos perecederos, sin embargo, por sí sola no es capaz de mantener la calidad e inocuidad de los mismos. Es por ello, que se ha combinado con otras técnicas de conservación, como el envasado en atmósferas modificadas, el vacío, los pulsos eléctricos, campos magnéticos, la irradiación y el uso de ingredientes antimicrobianos. Este último tratamiento presenta gran interés por parte de la industria ya que además de prevenir la alteración de alimentos también pueden eliminar los microorganismos patógenos.(2,3).

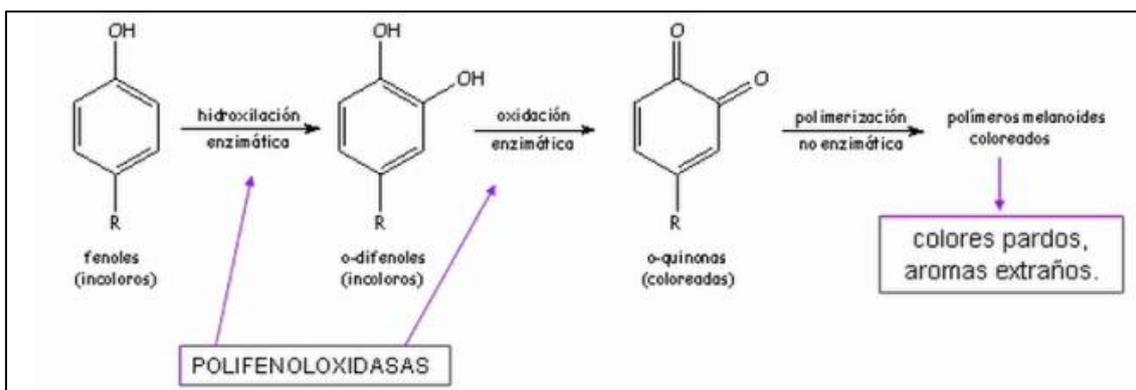
Los productos perecederos que no han sido conservados adecuadamente son desechados. La Organización de las Naciones Unidas, estiman que cada año un tercio de la producción mundial se desecha, aunque otros organismos estiman en que la cantidad de alimento que se desecha puede alcanzar el 40% (4). En España, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (5), indica que en el año 2019, los hogares españoles desecharon un total de 1,352 millones de kg/L de alimentos y bebidas. Así mismo, se calcula que 1.1146 millones de esa cantidad, corresponde a productos frescos, principalmente frutas, verduras y hortalizas. Además, el Ministerio indica, según las encuestas realizadas por éste, que 8 de cada 10 hogares españoles reconocen desperdiciar alimentos.

### 1.1. Alteración en la calidad de vegetales y frutas

De acuerdo con Kiracou et al.(6) la calidad de frutas y vegetales es un conjunto de las propiedades fisicoquímicas y percepción del consumidor que no son estáticas, que cambian con el tiempo. Así mismo, esos autores resaltan que los principales aspectos de calidad de frutas y vegetales son: firmeza, color, azúcares solubles, contenido en ácidos orgánicos y compuestos volátiles. El color es una de las características sensoriales más importantes y posiblemente, es la más utilizada por el consumidor en el momento de la elección de estos alimentos.

La alteración del color en los vegetales se puede deber a dos causas: el pardeamiento enzimático y el pardeamiento no enzimático. El pardeamiento enzimático de los alimentos, generalmente está asociado a una disminución de la calidad sensorial debido a cambios en el sabor, color, disminución de la dureza y la alteración de las propiedades nutritivas que se pueden llevar a cabo durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, sin embargo, en algunas ocasiones este pardeamiento puede mejorar las propiedades sensoriales de algunos productos como por ejemplo la uva seca, las hojas de té fermentadas, los dátiles entre otros. (7). El pardeamiento enzimático, es un conjunto de reacciones que provocan un cambio generalizado del color de frutas y verduras. (8)

La intensidad de los compuestos pardos formados depende principalmente de la presencia de oxígeno, sustancias reductoras, iones metálicos, pH, temperatura y la actividad de diferentes enzimas oxidantes, especialmente las polifenol oxidasas. Estas enzimas, contienen cobre en su centro activo que cataliza dos reacciones en presencia de oxígeno molecular. La actividad monofenolasa, que se encarga de la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y por otro lado la actividad difenolasa, que se encarga de catalizar la oxidación de o-difenoles a o-quinonas (ver Figura 1). Las polifenol oxidasas están presentes en algunas bacterias y mohos, en la mayoría de vegetales como: el trigo, el té, las patatas, los pepinos, la lechuga, la pera, la papaya, las uvas, el mango, la manzana, así como en las semillas del cacao. Los estudios histológicos revelan que las polifenoloxidasas (PPO) se encuentran en localizados en los cloroplastos. Debido a que prácticamente todas las PPO estudiadas, como ya se mencionó anteriormente, tienen la habilidad de convertir los o-dihidroxifenoles a o-benzoquinonas, usando oxígeno molecular como segundo sustrato y puesto que en los vegetales existe una cantidad importante de compuestos fenólicos con grupos OH ionizables, es de esperar una alta formación de pardeamiento enzimático cuando los alimentos son almacenados o manipulados durante los procesos de producción.(6).



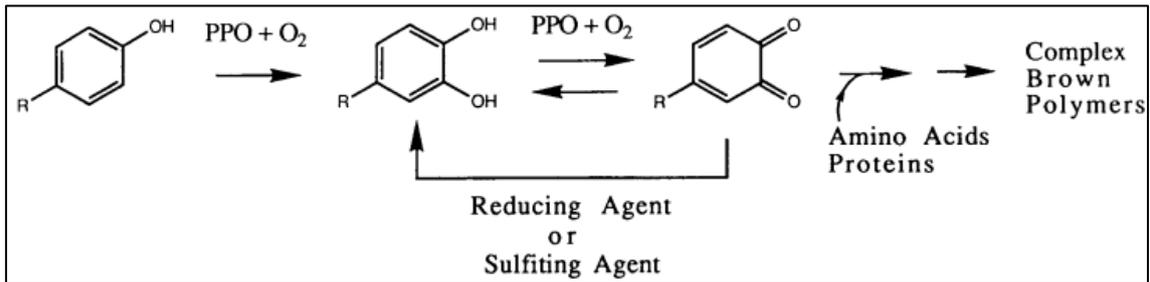
**Figura 1. Mecanismo de acción de las polifenol oxidasas.**

## 1.2. Estrategias empleadas para evitar el pardeamiento en vegetales y frutas.

Según los mecanismo de actuación los inhibidores del pardeamiento enzimático se pueden clasificar en seis grupos: agentes reductores, acidificantes, agentes quelantes, agentes complejos, tratamientos e inhibidores enzimáticos (9)

Entre los agentes reductores más usados por la industria alimentaria para controlar el pardeamiento, encontramos a los sulfitos. Estos son muy eficaces para inhibir tanto a las reacciones de pardeamiento enzimático y el pardeamiento no enzimático. Independientemente de su alta eficacia, su uso está sujeto a muchas restricciones puesto que pueden provocar reacciones similares a las alergias en ciertas poblaciones y por consiguiente la FDA ha establecido limitaciones para su utilización. Es por ello que se buscan nuevas alternativas al uso de sulfitos para la conservación de frutas y vegetales (9). Un compuesto reductor alternativo ampliamente usado es el ácido ascórbico, que ha sido durante muchos años usado como alternativa a los sulfitos. Sin embargo, este ácido tiene algunos inconvenientes entre las que podemos mencionar la insuficiente penetración dentro la matriz celular y la inespecificidad. (Ver Figura 2). Así mismo, se han desarrollado una serie de ésteres

de 2 y 3 fosfatos de ácido ascórbico que liberan este ácido cuando son hidrolizados por fosfatasas ácidas ya que el ácido ascórbico se oxida rápidamente. El rendimiento mejorado de los ésteres puede deberse principalmente a su estabilidad oxidativa, como se refleja en el tiempo de retraso para el inicio del pardeamiento obtenidos con estos derivados, en comparación con concentraciones equivalentes de ácido ascórbico. Los ésteres de fosfato del ascórbico son menos efectivos a pHs bajos, probablemente como resultado de la inhibición del ácido fosfatasa. La eficacia de los ésteres de fosfato como inhibidores de pardeamiento depende de su penetración en el alimento, el pH y la actividad del ácido endógeno fosfatasa. (9)



**Figura 2. Diagrama de iniciación del pardeamiento enzimático por la polifenol oxidasa y acción del uso de sulfitos y agentes reductores.**

Otra manera de controlar el pardeamiento enzimático es mediante el uso de los acidulantes. Su función consiste en bajar el pH de los alimentos por debajo de pH 4, valor al que generalmente se inactivan las enzimas PPO que presentan su actividad óptima a valores de pH 6-7. El ácido cítrico es el acidulante más utilizado en la industria para la prevención del pardeamiento. Este ácido tiene un efecto inhibitorio doble sobre la PPO: por un lado, disminuye el pH y por otro, atrapa al cobre del sitio activo de la enzima. Generalmente, el ácido cítrico se emplea en combinación con otras sustancias anti-pardeamiento. Algunas alternativas al uso de ácido cítrico es el uso de ácidos orgánicos, como el málico o tartárico, o bien ácidos inorgánicos, como el ácido fosfórico y clorhídrico. Pero estos suponen algunas desventajas en comparación con el ácido cítrico debido a su disponibilidad, precio e impacto negativo en el gusto. (9).

Por último, la industria muchas veces emplea agentes quelantes para evitar el pardeamiento. La enzima polifenol oxidasa (PPO) contiene cobre en su centro activo. Se cree que los agentes quelantes se unen al cobre en el sitio activo del enzima o reducen la cantidad de cobre disponible para la incorporación en la holoenzima. (9)

El pardeamiento no enzimático consiste en la condensación de un grupo aldehído o cetona de un azúcar con un grupo amino libre, la cual se reorganiza para formar una cetamina estable y finalmente degradarse a productos reactivos que contienen grupos carbonilo. Éstos pueden reaccionar con grupos amino dando lugar a polímeros oscuros.

Existen 4 rutas principales para el pardeamiento no enzimático:

- a. Reacción de Maillard
- b. Oxidación del ácido ascórbico

- c. Caramelización
- d. Peroxidación de los lípidos

La reacción de Maillard, es el resultado de productos reductores, que reaccionan con proteínas o grupos amino libres. Se da en alimentos ricos en hidratos de carbonos y proteínas. Depende de las condiciones ambientales, el pH y la temperatura.

La oxidación de ácido ascórbico (vitamina C) es catalizada por el pH bajo y temperaturas altas. Es por ello que los productos de descomposición tras la oxidación del ácido ascórbico causan la formación de compuestos pardos y la disminución del valor nutricional.

La caramelización se produce cuando los azúcares son calentados por encima del punto de fusión en ausencia de proteínas o aminoácidos. Puede afectar a la calidad del producto y se puede prevenir controlando la temperatura.

La peroxidación de los lípidos es debida a la acción del oxígeno sobre los ácidos grasos, es especial los ácidos grasos insaturados. Se oxidan formando aldehídos y cetonas que reaccionan con aminoácidos para formar pigmentos pardos. (10)

### **1.3. Alteración en la calidad de la carne.**

Otro grupo de alimentos altamente demandados por los consumidores es la carne. Uno de los motivos de la demanda es debido a su alto valor biológico. Según datos del gobierno de España, en el año 2020 se produjo un aumento del consumo de carne en 10,5%. Se calcula, según los datos recogidos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (11), cada español de media, consume unos 50kg de carne al año de los cuales el 72,6% que se emplean en uso doméstico, es carne fresca. La carne procesada alberga un 12,5% del consumo y la congelada en torno a un 20,4%. En el año 2020, los individuos que más productos cárnicos consumieron fueron los castellano-leoneses. La carne más consumida en los hogares fue la carne de pollo, seguida de la de cerdo y vacuno.

La descomposición de los aldehídos juega un rol importante en la aceptación del producto por parte del consumidor ya que estos pueden producir olores y sabores desagradables. Esta descomposición de los aldehídos es la responsable en la carne como el característico sabor a recalentado o de la oxidación lipídica. La oxidación se produce porque la carne posee en sus membranas ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) los cuales son más sensibles a la oxidación. Cuando la carne se procesa, las células que la componen rompen sus membranas liberando su contenido y dejando expuesto a los PUFAs al estrés oxidativo. Por otro lado, el desarrollo del “sabor recalentado” puede comenzar tras varias horas de cocción del producto cárnico en comparación con la oxidación regular de lípidos puede tardar varios días en desarrollarse.

En función de la carne elegida por el consumidor estará expuesto a unos problemas u otros de oxidación, por ejemplo, los pescados y otros tejidos musculares presentan niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados ( PUFAs) lo que hace que sean más sensibles a la oxidación de los mismos. La carne de pollo, tiene menor tendencia a la oxidación ya que contiene niveles elevados de vitamina E, lo que hace que dicho proceso se retarde. Comparando la carne roja con la carne blanca, la carne roja contiene mayores niveles de lípidos y hierro-hemo y por lo tanto mayor susceptibilidad a la oxidación. Si en la carne fresca se han producido pequeñas

oxidaciones enzimáticas, pueden generarse compuestos autocatalíticos que propagan la oxidación, independientemente de que las enzimas hayan sido inactivadas por el tratamiento térmico.(12, 13)

La oxidación lipídica (14,15) es una de las principales causas que afectan a la calidad de la carne, seguido de las condiciones de almacenamiento a las temperaturas de refrigeración o congelación. La oxidación lipídica influye en numerosas ocasiones en la aceptación del producto por parte del consumidor ya que dicho mecanismo puede influir sobre el olor de los mismos.

La oxidación lipídica se produce en presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y oxígeno. En este proceso, el oxígeno atmosférico se une a los ácidos grasos, desarrollando una serie de reacciones donde los productos intermediarios pueden dar lugar a sabores y olores desagradables. El mecanismo más importante y común es la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que interactúan con el oxígeno produciendo radicales libres que se desarrolla en tres etapas:

- a) Iniciación, la reacción directa de los ácidos grasos con el oxígeno es muy improbable ya que la molécula lipídica se encuentra en un estado electrónico singlete y la molécula de oxígeno está en un estado electrónico triplete. Para que se produzca, el oxígeno ha de activarse y puede hacerlo a partir de los siguientes mecanismos: 1. Formación de oxígeno singlete, 2. Formación de oxígeno parcialmente reducido o activado, como peróxido de hidrógeno, anión superoxi o radical hidroxilo, y 3. Formación de complejos activos oxígeno-hierro. Además, la oxidación de ácidos grasos puede deberse a la acción de diferentes enzimas como las peroxidasas, enzimas microsomales, lipooxigenasas o ciclooxigenasas.
- b) Propagación, el radical lipídico reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical lipídico peroxi. Este radical, es capaz de captar un hidrógeno de otro ácido graso insaturado y por consiguiente propagar la reacción en cadena.
- c) Terminación. Para romper la reacción en cadena de la fase de propagación pueden producirse dos mecanismos: el acoplamiento radical-radical o bien una desproporción radical-radical. Los radicales peroxi secundarios y primarios, terminan de manera eficaz por un mecanismo en donde el tetróxido se descompone para dar lugar al oxígeno molecular, un alcohol y un compuesto carbonilo

#### **1.4 El uso de antioxidantes en la carne**

Los antioxidantes son sustancias que pueden retardar o anular la oxidación de los lípidos o incluso moléculas capaces de iniciar este proceso. Se clasifican en dos categorías básicas: sintéticos o naturales (16). Dentro de los antioxidantes sintéticos más empleados por la industria cárnica podemos encontrar el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA), la terbutilhidroquinona (TBHQ) y los ésteres del ácido gálicos. Estos antioxidantes tienen como desventaja que son volátiles y se descomponen fácilmente a temperaturas elevadas y su presencia ha sido objeto de debate respecto a su seguridad y toxicidad (17), por lo que su uso está muy limitado tanto en cantidad como en tipo de derivado cárnico en el que se puede usar.

La industria cárnica ha buscado aditivos antioxidantes naturales. El aditivo antioxidante natural más empleado es el ácido ascórbico o sus sales, aunque también se usa de forma profusa el eritorbato, un compuesto similar al ascorbato en cuanto a estructura química, pero de origen puramente sintético (18).

Actualmente, con la finalidad de disminuir los aditivos en los alimentos, se están estudiando y en algún caso empleando ingredientes alimentarios o sus extractos con efecto antioxidante: extractos crudos de frutas, hierbas, vegetales y otras plantas ricas en compuestos fenólicos, terpenos u otros fitoquímicos que retrasen la oxidación de los lípidos. Algunos de estos compuestos no solo son capaces de ralentizar la degradación oxidativa de los lípidos, sino que también muestran propiedades funcionales (19,20). El efecto antioxidante de estos ingredientes naturales depende de su composición, concentración en el alimento, propiedades de la matriz alimentaria y condiciones del procesado y de almacenamiento (21, 22).

### 1.5. El lúpulo como ingrediente antioxidante

El lúpulo, *Hummulus lupulus*, se trata de una planta trepadora, de la familia de las cannabáceas, rizocárpica. Se trata de una especie dioica, en la que las flores forman una especie de racimos en forma de cono y que además tienen lupulina, una sustancia de color ámbar, con un sabor amargo y un aroma característico. La finalidad principal de este cultivo es la fabricación de cerveza.



**Figura 3. Flor del lúpulo, *Hummulus lupulus*.**

A nivel mundial, los principales países productores de lúpulo son Alemania, Estados Unidos y España, en lugares donde se dan unas condiciones óptimas para dicho cultivo: suelos arenosos o arcillosos profundos y fáciles de drenar, una alta exposición a la luz durante el crecimiento de la planta y temperaturas frías (23). En España, la mayor superficie de cultivo se encuentra en la provincia de León, representando un 97% del total nacional. Se trata de un sector muy condicionado por la industria cervecera, a la que se le dedica casi toda la producción. Por otro lado, un porcentaje muy pequeño se destina a productos terapéuticos y cosméticos (24).

Los componentes principales del lúpulo son las resinas, los aceites esenciales y los flavonoides (23) y muchos de estos componentes tienen potencialmente un efecto antioxidante, además de efecto antimicrobiano (25, 26). Las resinas se clasifican en dos grupos: blandas y duras. Las resinas blandas pueden dividirse en alfa-ácidos y beta-ácidos, una vez hidrolizados por

calentamiento proporcionan un sabor amargo característico. La fracción alfa-ácido se compone de una mezcla de cinco humulonas análogas : la humulona (35-70%) cohumulona (20-55%) adhumulona (10-15%) prehumolona (1-10%) y poshumulona (1-3%). La estructura beta-ácidos (lupulonas), conjugado con humulonas, es la responsable de sus propiedades físico-químicas, entre las que podemos destacar, la capacidad para quelar metales como Fe y Cu, comportarse como ácido débil y proporcionar color. Las humulonas presentan actividad antioxidante en la eliminación de radicales libres y en la inhibición de la peroxidación de lípidos.

Los aceites esenciales del lúpulo se producen en las glándulas de lupulina. Éstas proporcionan los aromas característicos del lúpulo ya que pueden ser más amargos, más cítricos, florales, afrutados, etc. La mayor parte de aceites esenciales del lúpulo están formados por terpenoides (0,3-1,0 %), principalmente sesquiterpenos, como el cariofileno o el humuleno, y monoterpenos, como el mirceno, que provienen de la vía biosintética del acetato-mevalonato. En los aceites esenciales han sido identificados diferentes componentes como los terpenoides principalmente sesquiterpenos ( $\beta$ - cariofileno, farneseno y humuleno) y monoterpenos (mirceno). Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos con funciones diferentes en las plantas. En el lúpulo, los flavonoides normalmente se pueden encontrar en formas glicosiladas de quercetina, keamperol, morina y miricetina, siendo la primera la que presenta el mayor poder antioxidante. Asimismo, se han identificado otros compuestos polifenólicos como los taninos condensados y los ácidos fenólicos (ferúlico y ácidos clorogénicos) (27). La concentración de los distintos componentes depende de diversos factores como: las técnicas de cultivo, el grado de madurez en el momento de cosechar, los tratamientos como el secado, peletizado y almacenamiento.

Recientemente, se está desarrollando el uso del lúpulo en elaboración de alimentos distintos a la cerveza como bebidas, productos de panadería y confitería, cereales, salsas, mezclas de especias o gomas de mascar (28, 29). Además, los brotes del lúpulo han sido empleados en ensaladas y sopas en donde el amargor es aceptado, mientras que las inflorescencias secas son usadas en té, ya sea en forma picada como tal o en mezclas. A pesar del probado efecto antioxidante del lúpulo y el creciente interés en la diversificación de su uso, no se han encontrado estudios donde se evalúe el efecto del lúpulo frente a la oxidación enzimática de las frutas y verduras y solo se han encontrado los estudios de Villalobos-Delgado et al. (30) y Carballo et al. (31) donde se muestran que el uso de extractos de lúpulo aumenta la estabilidad oxidativa lipídica en las hamburguesas y salchichas frescas respectivamente.

## 2. Objetivos.

El objetivo general de este trabajo es estudiar el efecto del lúpulo como antioxidante sobre el pardeamiento enzimático y sobre la oxidación lipídica de la carne de codero. De manera específica consiste en:

- Evaluar el efecto de lúpulo en infusión sobre el pardeamiento enzimático de manzana.
- Analizar el efecto de lúpulo en infusión sobre la oxidación lipídica en carne cocinada.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Plan del experimento, infusión de lúpulo y muestras de análisis

En este trabajo de investigación se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar el efecto antioxidante del lúpulo. El primero evaluó el efecto del lúpulo en infusión sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en rodajas de manzana y el segundo evaluó el efecto del lúpulo en infusión sobre la autooxidación de la carne cocinada. Para ello se utilizaron dos variedades de lúpulo: Cascade y Nugget, en infusiones equivalentes a 1 g y 2 g de lúpulo por litro de agua. La manzana o la carne se sumergieron en las infusiones y se evaluó el efecto antioxidante midiendo a lo largo del tiempo el índice de pardeamiento de la superficie de la manzana, con un colorímetro de reflectancia, o la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT), indicador de la oxidación lipídica, en la carne cocinada.

Para la preparación del lúpulo en infusión se pesaron 2 gramos de lúpulo de cada una de las variedades antes mencionadas y se añadió a 1 litro de agua. Posteriormente, la mezcla se llevó a temperatura de ebullición y se mantuvo hirviendo durante 30 minutos. Una vez pasado ese tiempo se filtró a través papel de filtro con un embudo Büchner y la ayuda de una trompa de vacío. La infusión se llevó a volumen de 1 l para compensar las pérdidas por ebullición, se enfrió y fue dividida en dos partes de 500 ml. Una parte se utilizó en los experimentos y la otra se diluyó con 500 ml de agua para obtener una concentración equivalente de 1g de lúpulo/l de infusión. Finalmente, las dos infusiones se distribuyeron en frascos con capacidad para 100 ml y se almacenaron en congelación a -18°C hasta su uso.

Las manzanas utilizadas fueron de la variedad reineta, obtenidas en el mercado local. La carne analizada fue de cordero; en concreto se empleó el vasto medio del músculo *cuádriceps femoris* de piernas de cordero de cebo obtenidas también en un mercado local. (Figura 4.)

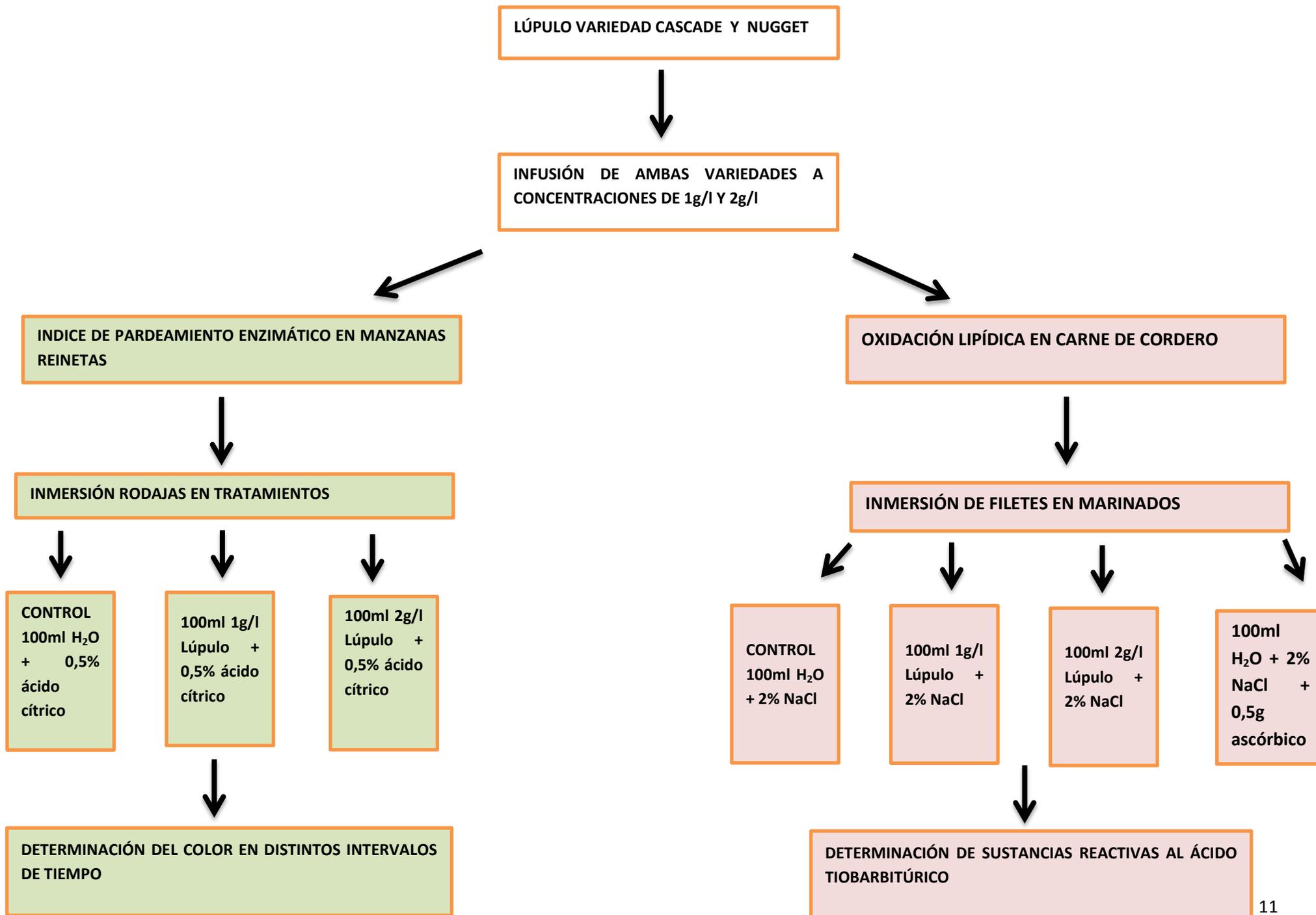


Figura 4. Plan experimental de uso de infusión de lúpulo en manzanas reinetas y carne de cordero.

### **3.2. Experimento 1. Pardeamiento enzimático: preparación de las muestras y muestreo.**

El procedimiento realizado para el ensayo del pardeamiento enzimático llevó a cabo por duplicado con cada una de las variedades de lúpulo en días diferentes.

En el día del análisis se prepararon tres soluciones de trabajo con un volumen de 100 ml: una solución control con 0,5% de ácido cítrico (CON), que es comúnmente utilizado para frenar el pardeamiento, otra solución con la infusión de 1 g de lúpulo/l a la que se adicionó 0,5% de ácido cítrico (1 g/l) y otra con la infusión de 2 g/l de lúpulo también con 0,5% de ácido cítrico (2 g/l). El propósito de preparar estas soluciones fue evaluar si el lúpulo mejora la acción de ácido cítrico y si esta mejora es proporcional a la cantidad de lúpulo utilizada. Una vez preparadas, a cada solución se le midió su pH. El control tenía un pH de 2,47, las soluciones de lúpulo que contenían 1 y 2 g/L para *Humulus lupulus L. cv. Cascade* tuvieron unos pH medios de 2,52 y 2,39, respectivamente. Para *Humulus lupulus L. cv. Nugget* el pH para las concentraciones 1g/l y 2g/l fueron 2,47 y 2,38. El pH de las soluciones se midió empleando un medidor de pH (Basic C20 Crison) equipado con un electrodo de punción.

Inmediatamente antes del ensayo, se cortó la manzana en rodajas con un corte transversal con un grosor de 1 cm, evitando la parte central con las semillas y la rodaja más superficial con la piel. Acto seguido, las rodajas se sumergieron completamente en cada una de las soluciones durante 5 min, dando la vuelta a la rodaja a los 2,5 min. Pasado ese tiempo se extrajeron las rodajas con ayuda de unas pinzas, se escurrieron unos segundos y cada rodaja se cortó 4 trozos y éstos se colocaron en placas de Petri, una por cada rodaja, que se mantuvieron en oscuridad a 4 °C durante el tiempo que duró el análisis. Durante el almacenamiento se midió el color en los siguientes intervalos de tiempo: 0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 265 min y 385 min, utilizando en cada medida una de las porciones obtenidas.

### **3.3. Experimento 2. Autoxidación lipídica: preparación de las muestras y muestreo.**

Se preparó un control con 100 ml de agua y 2 gramos de sal cuyo pH fue de 7,98. Respecto a los tratamientos con la infusión de lúpulo de ambas variedades se tomaron 100 ml para cada una de las concentraciones y a cada una de ellas se les añadió 2 g de sal. El valor del pH para *Humulus lupulus L. cv. Cascade* con concentración de 2g/l y 1g/l fueron 8,28 y 8,21 respectivamente. Para *Humulus lupulus L. cv. Cascade*, el valor del pH para las concentraciones de 2g/l y 1g/l fue de 7,83 y 7,97 respectivamente. Por último se estableció un último tratamiento con 2 gramos de sal y 0,5 gramos de ácido ascórbico que se diluyeron en 100ml de agua cuyo pH fue de 2,85. El pH de las soluciones se midió empleando un medidor de pH Basic C20 equipado con un electrodo de punción.

En primer lugar se prepararon cuatro soluciones de trabajo de 100 ml cada una: un control con 100 ml de agua y 2 gramos de sal (CON), cuyo pH fue de 7,98, otras dos con 100 ml de cada una de las concentraciones de lúpulo, 1g/l y 2 g/l (para cada variedad) y 2 g de sal (1 g/l y 2 g/l), con pH de 8,28 y 8,21, respectivamente, en el caso de *Humulus lupulus L. cv. Cascade*, y 7,83 y 7,97 para la *Humulus lupulus L. cv. Nugget*, y otra solución con 100 ml de agua, 2 g de sal y 0,5 g de ácido ascórbico (ASC), con pH de 2,85, que es un antioxidante frecuentemente utilizado en la industria cárnica. El objeto de incluir esta solución fue contrastar el eventual

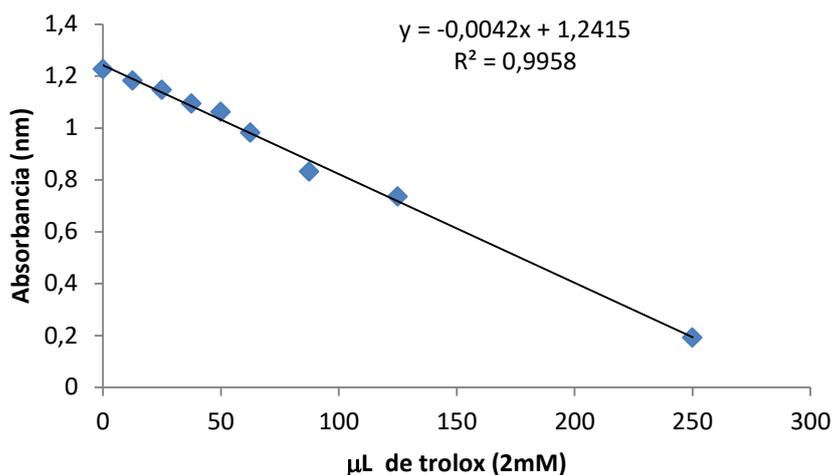
efecto antioxidante del lúpulo con el del ácido ascórbico. El pH de las soluciones se midió empleando un medidor de pH Basic C20 CRISON equipado con un electrodo de punción.

Una vez preparadas las soluciones, se midió el pH de la pieza de músculo analizado se cortó transversalmente se cuatro filetes de 1 cm de grosor, uno para cada una de las soluciones o tratamientos, y se pesaron. Se sumergieron los filetes de cordero en las soluciones previamente preparadas asegurándose de que la muestra quedase completamente sumergida y se mantuvieron inmersión a 4 °C durante 24 h. Pasado ese tiempo, se sacaron los filetes de los tratamientos y se retiró el exceso de líquidos con papel, se pesaron de nuevo los trozos y se volvió a medir el pH. A continuación, los filetes se envasaron al vacío en bolsas de vacío y se cocinaron en un baño a 80°C durante 30 minutos. Se sacaron las muestras del vacío y se volvieron a pesar una vez cocinadas. Seguidamente se cortaron en dos partes, a una se le realizó el análisis de SRAT en el momento y la otra cubrió de film plástico de polietileno permeable al oxígeno y se mantuvieron en refrigeración durante seis días antes de realizarse el análisis de SRAT con el fin de evaluar la oxidación que se produjo en las muestras durante este almacenamiento.

#### **3.4. Estudio de la capacidad antioxidante.**

A las variedades de lúpulo se les determinó su capacidad antioxidante comparándolos con la capacidad antioxidante del trolox sobre el DPPH, expresándola en µg equivalentes de trolox por µg de lúpulo (32). Además, se comparó la capacidad antioxidante del lúpulo con la del antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT). En primer lugar, se realizó una curva patrón con trolox. Se pesaron 0,0080 g del reactivo DPPH en una balanza de precisión y se diluyó en un matraz aforado de 100ml con etanol, previamente tarado y protegido de la luz. Para la obtención de la curva patrón se preparó una disolución de trabajo con una concentración 2mM. Se pesaron 0,117mg de trolox y se aforó en un matraz de 50 ml con etanol. A partir de la solución madre, se prepararon 8 patrones realizando diluciones seriadas: 0µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 125 µl, 150 µl, 200 µl. A partir de los patrones, se tomaron 2 ml de cada patrón en tubos de ensayo de 10 ml con tapón de rosca. Añadir 2ml de la solución previamente preparada de DPPH. Los tubos se colocan en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Medir absorbancia a 517nm con un espectrofotómetro. En la figura 5, se muestra la curva de calibración del DPPH utilizada para realizar los cálculos de la capacidad antioxidantes o antiradicalaria.

Posteriormente, por duplicado, para cada variedad de lúpulo, de la dilución de 2g/l se realizaron cuatro diluciones con etanol y se tomaron 2 ml de cada una procediendo de la misma manera que lo explicado para los patrones. Igualmente, se determinó la capacidad antioxidante del BHT a partir de cuatro diluciones de entre 0,5 a 12 mg/ml.



**Figura 5. Curva de calibración para calcular la capacidad antioxidante o antiradicalaria del DPPH en función de trolox**

El **color** superficial de las rodajas de manzana se determinó con un colorímetro Konica Minolta CM-700d en la parte central de la superficie de corte de las rodajas. Antes de la medida el aparato fue programado con el iluminante D65, en modo SCI, con una apertura de 11 mm para la iluminación y 8 mm para la medición y un ángulo visual de 10° y calibrado. Se registraron los valores de las coordenadas L\*, luminosidad; a\*, índice de rojo/verde y b\* amarillo/azul. A partir de estos valores se calculó el índice de pardeamiento. (33)

$$IPE = \frac{(X-0,31)}{0,17} \times 100, \text{ donde } X = \frac{(a^*+1,75L^*)}{(5,645L^*+a^*-3,012b^*)}$$

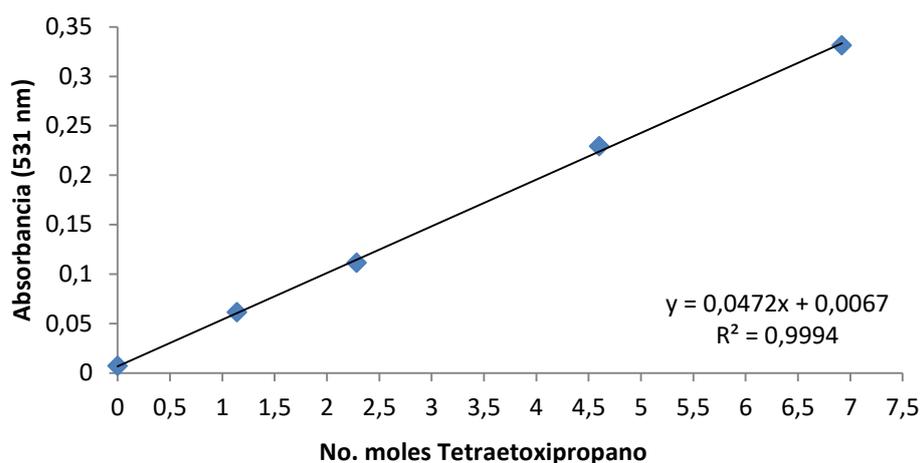
IPE= índice de pardeamiento

L\*= luminosidad;

a\*=índice de rojo/verde

b\*= amarillo/azul.

La **estabilidad oxidativa de la carne** de cordero se determinó siguiendo el procedimiento de Nam y Ahn (2003), que determina las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT) por colorimetría. Las porciones carne cocinada se homogeneizaron con una picadora doméstica y por duplicado se tomaron alícuotas de 2 g, que se homogeneizaron en 20 ml de agua con un Ultraturrax T18 Basic (IKA-Werke; Staufen, Alemania). La mezcla se filtró con un colador, se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de vidrio con rosca, inmediatamente se adicionaron 50 μl de una disolución de butil-hidroxitouleno (7,2 % en etanol p/v) y después 2 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico 20 mM en ácido tricloroacético al 15 %. Los tubos se calentaron durante 20 minutos a 80 °C, se enfriaron en agua corriente y el contenido de los mismos se filtró por un filtro de nylon de 0,45 μm, determinando su absorbancia a 531 nm (espectrofotómetro Spectronic 401). Para la cuantificación se realizó una recta de calibración con cantidades de 1 ml de las diluciones apropiadas de tetraetoxipropano (ver Figura 6), siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las muestras. Los resultados se expresaron como mg de malondialdehído por kg de carne.



**Figura 6. Curva de calibración usada para el cálculo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRAT)**

### 3.5. Análisis estadístico

Con los resultados medios obtenidos con cada variedad de lúpulo y para cada uno de los tiempos de análisis, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa IBM SPSS Statistic, versión 26 (SPSS Inc.) siguiendo el modelo lineal general y siendo el tratamiento o solución de inmersión el factor fijo. Cuando el ANOVA dio un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) se realizó con el mismo programa la prueba *post-hoc* de Tukey con el fin de establecer diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos ( $p < 0,05$ ) para cada tiempo de medida.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Capacidad antioxidante del lúpulo frente al DPPH.

En la tabla 1 se muestra la capacidad antiradicalaria de dos variedades de lúpulo variedades cascade y nugget frente al DPPH y del BHT equivalentes a la capacidad antioxidante que muestra 1  $\mu\text{g}$  de trolox. El *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* fue el que mostró mayor capacidad antioxidante frente al DPPH, de esta manera se requiere de 7,87  $\mu\text{g}$  de esta variedad de lúpulo para ejercer un efecto antioxidante de 1  $\mu\text{g}$  de trolox, mientras que la cantidad de lúpulo variedad nugget requerida para ejercer ese mismo efecto fue un 16% superior. Sin embargo, la capacidad antioxidante o antiradicalaria del BHT fue muy superior a la observada por las dos variedades de lúpulo, requiriéndose aproximadamente 100 más de lúpulo para ejercer la misma actividad antiradicalaria de éste compuesto. De acuerdo Kontek et al. (34) la capacidad antiradicalaria del lúpulo está relacionada con la concentración de alfa y beta ácidos. Estos autores encontraron una mayor capacidad antiradicalaria en las fracciones que contenían  $\alpha$  ácidos, es decir humulonas, y una baja capacidad antioxidante en aquellas fracciones que contenían los  $\beta$  ácidos, es decir, lupulonas. Si comparamos los resultados mostrados por esos autores con los obtenidos en este trabajo, observamos que la capacidad antiradicalaria observada por estos fue entre dos y cuatro veces más elevada que la encontrada en este

estudio, siendo *Hummulus lupulus L. cv. Nugget* la que menor capacidad antiradicalaria posee y esto podría deberse a su mayor contenido en lupulonas que *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*.

**Tabla 1. Capacidad antiradicalaria de dos variedades de lúpulo y de BHT equivalente frente al DPPH**

	<i>Lupulus Cascade</i>	variedad	<i>Lupulus Nugget</i>	variedad	BHT
<b>µg de compuesto/µg de trolox</b>	7,87		9,17		0,016

#### 4.2. Efecto del lúpulo sobre el pardeamiento enzimático

En la Tabla 2, se recoge el índice de pardeamiento enzimático (IPE) de rodajas de manzana reineta sometidas a distintas concentraciones de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* con un 0.5% ácido cítrico a diversos tiempos de tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre control y el tratamiento con 1 y 2g/l de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* a los minutos 10 y 30 de experimento. Sin embargo, a partir de los minutos 60 a 385 no se apreciaron diferencias significativas. Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* (1 y 2 g/l) a ningún tiempo de tratamiento. Aunque se puede observar una tendencia un menor índice de pardeamiento con el tratamiento de 2g/l de lúpulo en comparación con el tratamiento de 1g/l. El IPE más alto, se obtuvo en el minuto 385 en las rodajas sometidas al control con un valor fue 88,80 y el menor índice fue obtenido a partir de la concentración 2 g/l. El lúpulo contiene diversos antioxidantes entre los que cabe destacar los alfa ácidos, flavonoides, terpenoides, a los que podríamos atribuir el mismo mecanismo antioxidante del ácido ascórbico es decir la habilidad de reducir la o-quinonas a difenoles, disminuyendo o incluso revirtiendo la formación de colores pardos, aunque su efecto disminuye una vez que estos antioxidantes se han oxidado (9). A éste último hecho podemos atribuir el menor índice de pardeamiento observado a partir de 60 min cuando se utilizó la solución de lúpulo.

En la Figura 7, podemos observar el pardeamiento enzimático de la manzana *var. reineta* sumergidas en distintas soluciones. En ella podemos ver un mayor pardeamiento en los trozos de manzana que fueron sumergidos en ácido cítrico (control). También podemos observar la diferencia de compuestos pardos entre los trozos de manzana sumergidas en una solución con 1 g/L y con 2 g/L de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*

Tabla 2. Índice de pardeamiento (IPE) de la manzana reineta utilizando distintas concentraciones y variedades de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* adicionado con ácido cítrico.

**IPE MANZANA REINETA CON TRATAMIENTO DE *HUMMULUS LUPULUS L. CV. CASCADE***

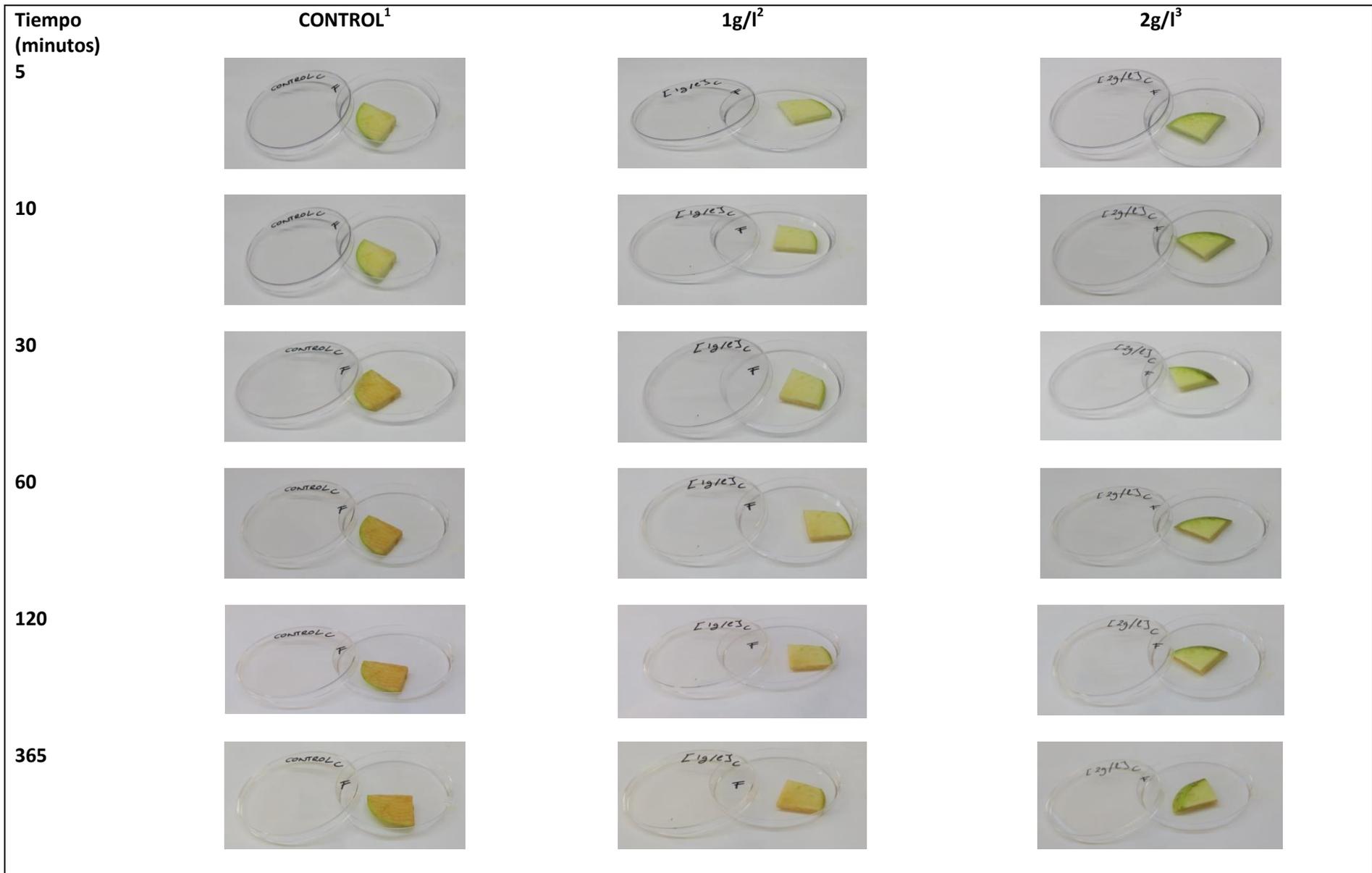
Tiempo (min)	Control <sup>1</sup>	1 (g/l) <sup>2</sup>	2 (g/l) <sup>3</sup>
5	34,88 ± 6,46 <sup>a</sup>	36,30 ± 1,36 <sup>a</sup>	31,99 ± 7,87 <sup>a</sup>
10	53,08 ± 12,04 <sup>a</sup>	43,67 ± 5,12 <sup>b</sup>	36,98 ± 0,31 <sup>b</sup>
30	53,02 ± 0,017 <sup>a</sup>	43,73 ± 0,35 <sup>b</sup>	42,13 ± 2,49 <sup>b</sup>
60	69,06 ± 3,45 <sup>a</sup>	69,18 ± 25,35 <sup>a</sup>	57,64 ± 0,12 <sup>a</sup>
120	69,81 ± 10,98 <sup>a</sup>	75,30 ± 3,07 <sup>a</sup>	64,22 ± 12,17 <sup>a</sup>
265	70,12 ± 17,99 <sup>a</sup>	79,04 ± 8,65 <sup>a</sup>	59,57 ± 14,10 <sup>a</sup>
385	88,80 ± 11,34 <sup>a</sup>	82,87 ± 1,23 <sup>a</sup>	76,62 ± 5,26 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Control: solución de ácido cítrico al 0,5%

<sup>2</sup>Concentración de lúpulo 1g/l + 0,5% ácido cítrico

<sup>3</sup>Concentración de lúpulo 2g/l + 0,5% ácido cítrico

<sup>ab</sup> Líneas con letras distintas muestran diferencias significativas ( p<0,05) entre los distintos tratamientos



<sup>1</sup>Control: solución de ácido cítrico al 0,5%

<sup>2</sup>Concentración de lúpulo 1g/l + 0,5% ácido cítrico

<sup>3</sup>Concentración de lúpulo 2g/l + 0,5% ácido cítrico

Figura 7. Evolución del índice del pardeamiento enzimático en rodajas de manzana variedad reineta inmersas en *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*

En la tabla 3, se muestra el índice de pardeamiento del tratamiento con lúpulo variedad Nugget. No se han encontrado diferencias significativas en el índice de pardeamiento entre los distintos tratamientos y el control. Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre ambas concentraciones de lúpulo de esta variedad. Cabe indicar que la concentración de 1 g/l de lúpulo variedad Nugget, mostró mayores valores de índice de pardeamiento respecto al control y a la concentración 2 g/l. Estos resultados podrían explicarse a la cantidad de concentración de los polifenoles presentes en las piezas de manzanas reineta, la cual puede variar si se mide en piel o en pulpa, incluso entre las diferentes piezas de manzanas siendo de una misma cosecha (35). Así mismo, la falta de inhibición del pardeamiento enzimática observada en este estudio se podría atribuir también a dos aspectos principalmente, por un lado, una la baja concentración de los antioxidantes presentes soluciones de lúpulo ensayadas y por otro lado, a la posible baja difusión de los componentes antioxidantes del lúpulo, debido a que su tamaño molecular es superior en comparación a otros antioxidantes como el ácido ascórbico.

En la Figura 8, se puede apreciar la formación de compuestos pardos los tres tratamientos ensayados: ácido cítrico, dos concentraciones de *Hummulus lupulus L. cv. Nugget* 1 y 2 g/. En ella podemos observar que la formación de compuestos pardos se inició 50 minutos en comparación con los tratamientos de *Hummulus lupulus L. cv. Nugget*, aunque como se mencionó anteriormente no se observaron diferencias significativas en el índice de pardeamiento. A través de la figuras podemos apreciar que el tratamiento de 1 g/L de lúpulo muestra mayor contenido de compuestos pardos, así mismo fue el tratamiento que mayor índice de pardeamiento mostró a lo largo de todo el tiempo que duro el ensayo (Tabla 3).

**Tabla 3. Índice de pardeamiento (IPE) de la manzana reineta utilizando distintas concentraciones y variedades de lúpulo variedad Nugget adicionado con ácido cítrico.**

**IPE MANZANA REINETA CON TRATAMIENTO DE *HUMMULUS LUPULUS L. CV. NUGGET***

Tiempo (min)	Control <sup>1</sup>	1 (g/l) <sup>2</sup>	2 (g/l) <sup>3</sup>
5	40,39 ± 1,38 <sup>a</sup>	46,59 ± 2,86 <sup>a</sup>	47,17 ± 1,98 <sup>a</sup>
10	40,03 ± 4,029 <sup>a</sup>	50,74 ± 0,35 <sup>a</sup>	45,67 ± 1,17 <sup>a</sup>
30	67,01 ± 3,53 <sup>a</sup>	56,59 ± 8,65 <sup>a</sup>	55,33 ± 18,23 <sup>a</sup>
60	65,95 ± 12,31 <sup>a</sup>	73,78 ± 1,63 <sup>a</sup>	57,60 ± 8,63 <sup>a</sup>
120	68,89 ± 11,71 <sup>a</sup>	78,53 ± 5,70 <sup>a</sup>	71,30 ± 1,97 <sup>a</sup>
265	80,81 ± 1,48 <sup>a</sup>	91,77 ± 8,29 <sup>a</sup>	80,11 ± 12,60 <sup>a</sup>
385	82,00 ± 4,90 <sup>a</sup>	107,49 ± 4,73 <sup>a</sup>	94,90 ± 20,79 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Control: solución de ácido cítrico al 0,5%

<sup>2</sup>Concentración de lúpulo 1g/l + 0,5% ácido cítrico

<sup>3</sup>Concentración de lúpulo 2g/l + 0,5% ácido cítrico

<sup>ab</sup> Líneas con letras distintas muestran diferencias significativas ( p<0,05) entre los distintos tratamientos.

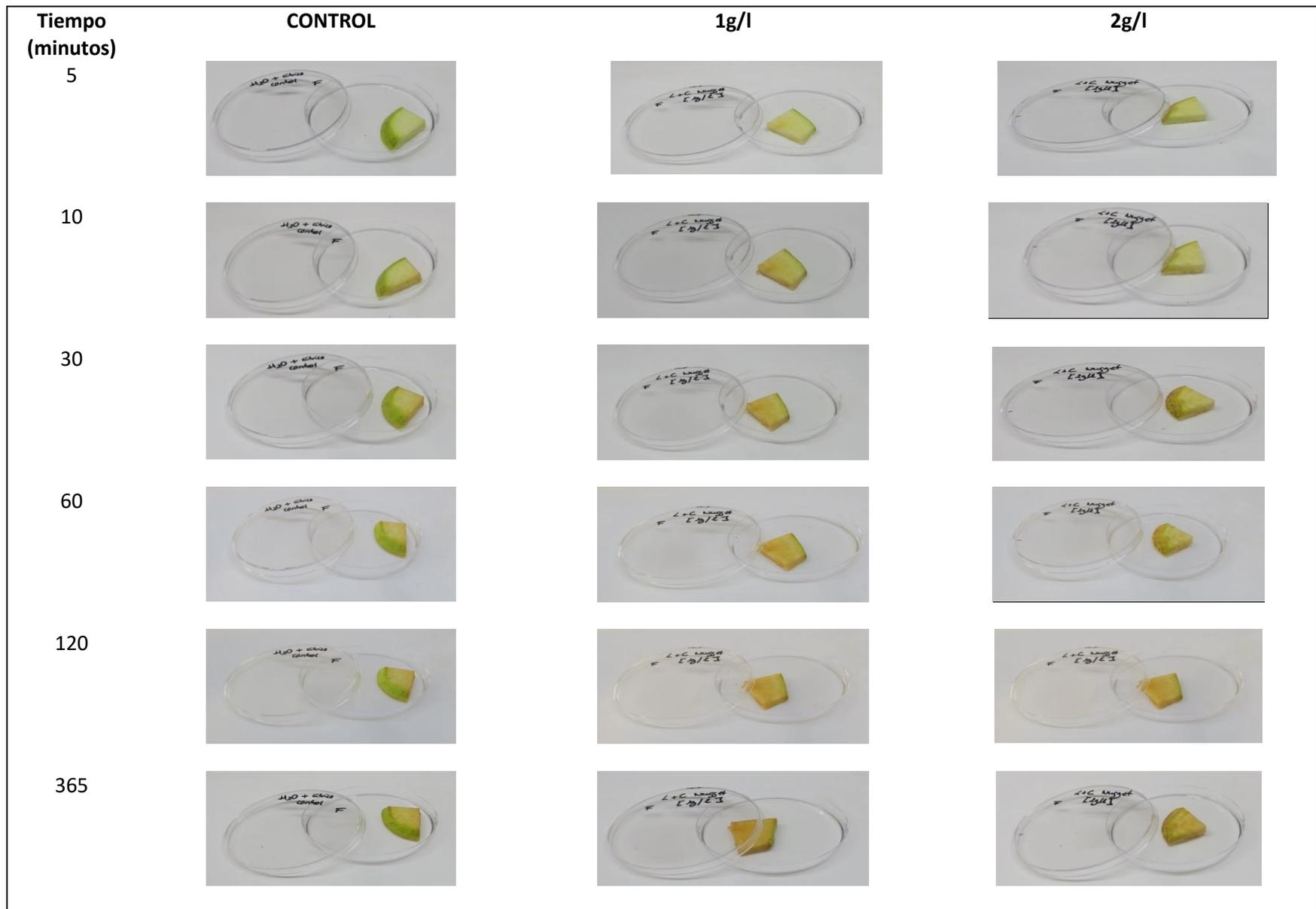


Figura 8. Evolución del índice del pardeamiento enzimático en rodajas de manzana variedad reineta inmersas en *Hummulus lupulus* L. cv. Nugget.

<sup>1</sup>Control: solución de ácido cítrico al 0,5%; <sup>2</sup>Concentración de lúpulo 1g/l + 0,5% ácido cítrico ; <sup>3</sup>Concentración de lúpulo 2g/l + 0,5% ácido cítrico

### 4.3. Efecto del lúpulo sobre la oxidación lipídica

Los valores de pH de la carne de cordero, así como el incremento de peso en el marinado y las pérdidas de peso durante la cocción de la carne madurada se muestran en las Tablas 4 y 5. Se observa cómo el tipo de marinado (diferenciado por los distintos antioxidantes que contiene la salmuera) no afectó a ninguna de las características tecnológicas antes mencionadas.

**Tabla 4. Valores de pH de la carne de cordero y rendimientos en el marinado y la cocción en función del tratamiento de marinado con *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*.**

	CON <sup>1</sup>	1 g/l <sup>2</sup>	2 g/l <sup>3</sup>	ASC <sup>4</sup>
<b>pH</b>	5,88	5,79	5,83	5,81
<b>Incremento % de peso en marinado</b>	13,41%	14,75%	16,44%	15,87%
<b>Pérdidas % de peso por cocción</b>	45,75%	46,87%	49,74%	48,51%

<sup>1</sup>CON: Marinado en una solución acuosa con sal al 2%

<sup>2</sup>1 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* (1 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>3</sup>2 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* (2 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>4</sup>ASC: Marinado en una solución acuosa con sal al 2% y ácido ascórbico al 0,5%

**Tabla 5. Valores de pH de la carne de cordero y rendimientos en el marinado y la cocción en función del tratamiento de marinado con *Hummulus lupulus L. cv. Nugget*.**

	CON <sup>1</sup>	1 g/l <sup>2</sup>	2 g/l <sup>3</sup>	ASC <sup>4</sup>
<b>pH</b>	5,87	5,89	5,78	5,80
<b>Incremento de peso en marinado</b>	13,36%	16,35%	10,87%	16,24%
<b>Pérdidas de peso por cocción</b>	45,81%	46,15%	52,09%	48,99%

<sup>1</sup>CON: Marinado en una solución acuosa con sal al 2%

<sup>2</sup>1 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus L. cv. Nugget* (1 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>3</sup>2 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus L. cv. Nugget* (2 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>4</sup>ASC: Marinado en una solución acuosa con sal al 2% y ácido ascórbico al 0,5%

En la Tablas 6 y 7 se muestran los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, indicador de la oxidación lipídica, en las muestras de carne marinada inmediatamente después de la cocción y tras seis días de almacenamiento aerobio a refrigeración. La composición de la salmuera en cuanto a antioxidantes se refirió ejerció un efecto significativo sobre los valores de TBARS. En concreto, la presencia de ácido ascórbico frenó significativamente la oxidación tanto en día 0 (solo en uno de los experimentos, Tabla 7), como, y especialmente en el día 6 de almacenamiento (Tablas 6 y 7). Sin embargo, las infusiones de lúpulo no mostraron efecto antioxidante ni a concentración baja, ni alta concentración. La carne cocinada que se empleó como control (CON) y la marinada en infusión de lúpulo, experimentaron una oxidación suficientemente alta como para ser percibida sensorialmente por los consumidores, ya que la percepción de la rancidez en carne de rumiante se relaciona con valores de TBARS superiores a 2 mg/kg. (36) Por el contrario, el ácido ascórbico mantuvo la carne por debajo de esos valores.

La ausencia de efecto antioxidante del lúpulo contrasta con lo encontrado en otros estudios, en los que infusiones de lúpulo demostraron efecto antioxidante cuando fueron adicionadas a las masas de hamburguesas o salchichas (30-37). Las concentraciones de lúpulo en la salmuera del marinado de este estudio fueron similares a las concentraciones de lúpulo adicionadas a las masas cárnicas de hamburguesa y salchicha en los otros estudios, por lo que la diferencia en la efectividad del lúpulo como antioxidante entre estudios no se puede atribuir a una diferencia en la cantidad de lúpulo. Lo que sí difiere entre este y los otros estudios es que en éste los compuestos del lúpulo solo llegaron a la carne a través de la superficie del filete, mientras que en los otros los compuestos del lúpulo se distribuyeron directamente el interior de la masa cárnica por mezclado. De este modo, en este estudio, probablemente la escasa difusión de los compuestos del lúpulo desde la superficie de los filetes hacia el interior y la presencia continua de oxígeno en la superficie del filete durante todo el almacenamiento fueron las causantes de inactivar el efecto antioxidante de los compuestos del lúpulo presentes en la superficie de los filetes después del marinado. Por lo tanto, el lúpulo en infusión, al contrario del ácido ascórbico no serviría como antioxidante de contacto en trozos de carne.

**Tabla 6 Oxidación de la carne de cordero cocinada<sup>#</sup> en función del tratamiento previo de marinado con *Hummulus lupulus* L. cv. Cascade antes (Día 0) o después de seis días de almacenamiento aerobio a refrigeración (Día 6)**

	CON <sup>1</sup>	1 g/l <sup>2</sup>	2 g/l <sup>3</sup>	ASC <sup>4</sup>
<b>Día 0</b>	0,41 ±0,04	0,50±0,01	0,93±0,07	0,82±0,03
<b>Día 6</b>	5,17 ± 0,73	5,87 ±0,56	6,18 ±1,65	1,23b ±027

<sup>#</sup> Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresados en mg por kg de carne (n = 2)

<sup>1</sup>CON: Marinado en una solución acuosa con sal al 2%

<sup>2</sup> 1 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus* L. cv. Cascade (1 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>3</sup> 2 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus* L. cv. Cascade (2 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>4</sup> ASC: Marinado en una solución acuosa con sal al 2% y ácido ascórbico al 0,5%

**Tabla 7 Oxidación de la carne de cordero cocinada<sup>#</sup> en función del tratamiento previo de marinado con *Hummulus lupulus* L. cv. Nugget antes (Día 0) o después de seis días de almacenamiento aerobio a refrigeración (Día 6)**

	CON <sup>1</sup>	1 g/l <sup>2</sup>	2g/l <sup>3</sup>	ASC <sup>4</sup>
<b>Día 1</b>	0,73±0,01	0,61±0,10	0,81±0,04	0,14±0,06
<b>Día 6</b>	6,04 ±0,32	5,33 ±0,89	6,12 ±0,15	2,93 ±1,41

<sup>#</sup> Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresados en mg por kg de carne (n = 2)

<sup>1</sup>CON: Marinado en una solución acuosa con sal al 2%

<sup>2</sup> 1 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus* L. cv. Nugget (1 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>3</sup> 2 g/l: Marinado en una infusión de *Hummulus lupulus* L. cv. Nugget(2 g lúpulo /l de agua) con sal al 2%

<sup>4</sup> ASC: Marinado en una solución acuosa con sal al 2% y ácido ascórbico al 0,5%

## 5. Conclusión

El índice de pardeamiento enzimático en manzanas reinetas fue inferior cuando se sometieron a los tratamientos con *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*, sin embargo, este efecto no se mantuvo con el tiempo. Además, el efecto inhibitor del pardeamiento enzimático mostrado durante los 30 y 60 min del ensayo parece estar influenciada por la concentración, observándose menor cantidad de compuestos de pardeamiento en la concentración de 2 g/l (ver Figura 7).

Las diferencias observadas en el índice de pardeamiento en las manzanas variedad reineta entre los distintos tratamientos puede deberse a una mayor concentración de compuestos antioxidantes presente en el *Hummulus lupulus L. cv. Cascade*, como se observó al analizar la capacidad antioxidante del lúpulo frente al DPPH, el *Hummulus lupulus L. cv. Cascade* mostró mayor capacidad antioxidante en comparación con el *Hummulus lupulus L. cv. Nugget*.

Se requieren más estudios para conocer la cantidad y tipo de antioxidantes que contiene el lúpulo de las dos variedades ensayadas en este trabajo para poder establecer las concentraciones adecuadas de lúpulo que presenten un efecto inhibitorio del pardeamiento enzimático.

En cuanto al análisis del marinado de carne de cordero cocinada, los tratamientos con infusión de lúpulo no ralentizan la oxidación lipídica durante el almacenamiento aerobio de la carne, solo el tratamiento con ácido ascórbico tuvo efectos significativos en la inhibición de la oxidación. Impregnar filetes de carne con compuestos antioxidantes del lúpulo, a las concentraciones utilizadas en este estudio, no resulta ser un tratamiento eficaz contra la oxidación.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AskUSDA (INTERNET). Ask.usda.gov.2021. Consultado el 21 de junio 2021. Disponible en:<https://ask.usda.gov/s/article/What-foods-are-perishable#:~:text=Perishable%20foods%20are%20those%20likely,Refrigeration%20slows%20bacterial%20growth>.
2. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 2005; 22(4):273–92.
3. Duan Y, Wang G-B, Fawole OA, Verboven P, Zhang X-R, Wu D, et al. Postharvest precooling of fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2020; 100:278–91.
4. Mercier S, Villeneuve S, Mondor M, Uysal I. Time-temperature management along the food cold chain: A review of recent developments: Food preservation along the cold chain. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(4):647–67.
5. El director general de la Industria Alimentaria valora la estabilidad de los datos de desperdicio alimentario en 2019 [Internet]. Gob.es. Consultado el 2 de junio de 2021. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/el-director-general-de-la-industria-alimentaria-valora-la-estabilidad-de-los-datos-de-desperdicio-alimentario-en-2019/tcm:30-543935>.
6. Kyriacou MC, Roupael Y. Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2018;234:463–9.
7. López-Nicolás JM, Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer Á, García-Carmona F. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem.* 2007;101(3):1164–71
8. López-Nicolás JM, Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer Á, García-Carmona F. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem.* 2007;101(3):1164–71.
9. Iyengar R, McEvily AJ. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci Technol.* 1992; 3:60–4.
10. PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO [Internet]. Studylib.es. 2016. Consultado por última vez: 24 junio 2021. Disponible en: <https://studylib.es/doc/4564390/pardeamiento-no-enzim%C3%A1tico>
11. MAPA. El director general de la Industria Alimentaria valora la estabilidad de los datos de desperdicio alimentario en 2019 [Internet]. Gob.es. Consultado por última vez el 2 junio de 2021. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/el-director-general-de-la-industria-alimentaria-valora-la-estabilidad-de-los-datos-de-desperdicio-alimentario-en-2019/tcm:30-543935>
12. Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation: Measurement methods [Internet]. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products.* Wiley; 2005.
13. Pegg, R.B., & Shahidi, F. Off flavors and rancidity in foods. En *Handbook of meat, poultry and seafood quality.* Blackwell Publishing, Iowa, USA. 2007 Págs. 217-228.
14. Erickson, M.C. Lipid oxidation of muscle foods. En *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology.* Eds. Akoh, C.C., Min, D.B. Marcel Dekker, New York, USA. 2002 Págs. 365-411.

15. Wrolstad, R.E., Acree, T.E, Decker, Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., & Sporns, P. Lipid oxidation/stability. En *Handbook of food analytical chemistry: water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates*. Wiley and Sons, New Jersey, USA. 2005. Págs, 513-564
16. Armenteros M, Ventanas S, Morcuende D. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos [Internet]. Eurocarne.com. Consultado por última vez 25 Junio 2021. Dsponible en: [http://eurocarne.com/daal/a1/boletin\\_imagenes/a2/20705.pdf](http://eurocarne.com/daal/a1/boletin_imagenes/a2/20705.pdf)
17. Mc Carthy, T.L., Kerry, J.P., Kerry, J.F., Lynch, P.B and Buckley, DJ. Assesment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 2001; 57,177-187.
18. Feiner, G. Burgers, patties and crumbed products. *Meat products handbook: Practical science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. 2006; CRC Press, 481–498.
19. Falowo, A.B., Fayemi, P.O. and Muchenje, V.,. Natural antioxidants againsts Lipid-Protein Oxidative Deterioration in Meat and Meat Products: A Review. *Food Res Int*. 2014; 64,171-181.
20. Kumar, Y., D.N., Ahmad, T and Narsaiah, K.,. Recent Trends ins the Use of Natural Antioxdants or Meat an Meat Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2015; 14 ( 6), 796-812.
21. Brewer, M.S. Natural Antioxidants: Sourcers, Compunds, Mechanisms of Action, and Potential Applicationes. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2011; 10 ( 4) 221-247.
22. Pokorny, J. Are Natural Antioxidants Better – and Safer- Than Synthetic Antioxidants? *Eur J Lipid Sci Technol*. 2007; 109 ( 6), 629-642.
23. Durello R, Silva L, Bogusz S Jr. QUÍMICA DO LÚPULO. *Quim Nova*. 2019;42:900–19.
24. Lúpulo [Internet]. Gob.es. Consultado por última vez 17 de Junio 2021. Dsponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/lupulo/>
25. Canbas, A., Erten, H., and Özşahin, F. The effects of sotrage temperature on the chemical composition of hop pellets. *Process Biochemistry*. 2001; 36, 1053-1058.
26. Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. Reducing power hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*. 2001; 72, 413-418.
27. Zanolli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., & Baraldi, M. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 102, 102-106.
28. Zanolli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 383-396
29. Attokaran, M. (2011). Hops. *Humulus lupulus* L (Urticaceae). In M. Attokaran (Ed.), *Natural food flavours and colorants* (pp. 241-244). Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd and Institute of Food Technologies.
30. Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & Mateo, J. (2015). Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small Ruminant Research*, 125, 73–80
31. Carballo DE, S Andrés, FJ Giráldez, A Khanjari, I Caro, D Llamazares. The effects of storage and hop extract on aroma and flavour compounds in Balkan-style sausages packed under a CO2-containing anaerobic atmosphere. *Heliyon* 2020; 6 (10), e05251

32. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci Technol*. 2005;25(4):726–32
33. Garzón-García AM, Dussán-Sarria S, Melo-Sevilla RE. Estudio de la Variación de Parámetros de Color del Yacón utilizando un Prototipo de Medición de Color y Temperatura. *CIT Inform Tecnol*. 2018;29(6):75–82.
34. Kontek B, Jedrejek D, Oleszek W, Olas B. Antiradical and antioxidant activity in vitro of hops-derived extracts rich in bitter acids and xanthohumol. *Ind Crops Prod*. 2021;161(113208):113208
35. Kunradi Vieira FG, da Silva Campelo Borges G, Copetti C, Valdemiro Gonzaga L, da Costa Nunes E, Fett R. Actividad y contenido de polifenoles antioxidantes en fruta entera, pulpa y cáscara de tres cultivares de manzana. *Arch Latinoam Nutr*. 2009;59(1):101–6.
36. Greene BE, Cumuze TH. Relationship between TBA numbers and inexperienced Panelists' Assessments of oxidized flavor in cooked beef. *J Food Sci*. 1982;47(1):52–4.
37. Carballo DE, Andrés S, Giráldez FJ, Khanjari A, Caro I, Llamazares D, et al. The effects of storage and hop extract on aroma and flavour compounds in Balkan-style sausages packed under a CO<sub>2</sub>-containing anaerobic atmosphere. *Heliyon*. 2020;6(10):e05251.