



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *IMPACTO DE LA MAGNETIZACIÓN DEL MATERIAL UVM-7 FUNCIONALIZADO SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ZUMO DE MANZANA Y SU POSIBLE REUTILIZACIÓN*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E  
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS.

ALUMNO/A: Elia Ruiz de Assín David

TUTOR/A ACADÉMICO: Ana María Andrés Grau  
COTUTOR/A :Ángel Luis Argüelles Foix  
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Sara Muñoz Pina

*Curso Académico:2020-2021*

**VALENCIA, 10 de septiembre de 2021**

# **IMPACTO DE LA MAGNETIZACIÓN DEL MATERIAL UVM-7 FUNCIONALIZADO SOBRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL ZUMO DE MANZANA Y SU POSIBLE REUTILIZACIÓN.**

Elia Ruiz de Assín David, Sara Muñoz Pina<sup>1</sup>, Ángel Lluís Argüelles Foix<sup>1</sup>, Ana María Andrés Grau<sup>1</sup>.

## **RESUMEN**

Las frutas y hortalizas son alimentos muy demandados actualmente gracias a los beneficios que poseen. Sin embargo, en estos productos el pardeamiento enzimático producido por la enzima polifenoloxidasas (PPO), conlleva un deterioro del color de estos, así como una pérdida de su valor nutricional lo que genera rechazo por parte del consumidor y en consecuencia grandes pérdidas económicas para la industria alimentaria. En el marco del presente estudio se ha analizado el efecto de la magnetización de materiales de sílice mesoporosos sin funcionalizar (M-UVM-7) y funcionalizados con aminas (UVM-7-NH<sub>2</sub>) y con tioles (UVM-7-SH) sobre el pardeamiento enzimático, así como sobre los compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides, flavonoles y capacidad antioxidante) presentes en el zumo de manzana. Por último, con el fin de reutilizar estos materiales se analizaron distintas estrategias de limpieza. En términos generales, se observó como el potencial fenólico del zumo de manzana se reducía siguiendo la misma tendencia que en presencia de la PPO para los tratamientos con M-UVM-7 y M-UVM-7-NH<sub>2</sub>. Sin embargo, el tratamiento con UVM-7-SH magnético preservó la estabilidad del color inicial del zumo de manzana medido a los 30 minutos de la retirada del material. Adicionalmente, la actividad antioxidante y el potencial fenólico presentaron escasas pérdidas (<20%). Finalmente, en cuanto a los sistemas de limpieza, destaca el mecanismo de agua acidificada debido a su capacidad de limpieza, su sencillez de aplicación y sus características económicas abriendo la posibilidad a la reutilización de los nanomateriales funcionalizados.

**PALABRAS CLAVE:** PPO, pardeamiento enzimático, material mesoporoso de sílice magnético, UVM-7, UVM-7-NH<sub>2</sub>, UVM-7-SH, zumo de manzana.

## **RESUM**

Les fruites i hortalisses són aliments molt demandats actualment gràcies als beneficis que posseeixen. No obstant això, en aquests productes l'enfosquiment enzimàtic produït per l'enzim polifenoloxidasas (PPO), comporta un deteriorament del color, així com una pèrdua del seu valor nutricional que genera el rebuig pel consumidor i en conseqüència grans pèrdues econòmiques. En el marc del present estudi s'ha analitzat l'efecte de la magnetització dels materials de sílice mesoporosos sense funcionalitzar (M-UVM-7) i funcionalitzats amb amines (UVM-7-NH<sub>2</sub>) i amb tiols (UVM-7-SH) sobre l'enfosquiment enzimàtic,

---

<sup>1</sup>Instituto universitario de ingeniería de alimentos para el Desarrollo (IUIAD-UPV). Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

així com sobre els compostos bioactius (polifenols, flavonoides, flavonols i capacitat antioxidant) presents al suc de poma. Finalment, s'analitzà la capacitat de reutilització d'aquests materials amb diferents estratègies de neteja. En termes generals, s'observà com el potencial fenòlic del suc de poma es reduïa seguint la mateixa tendència que en presència de la PPO amb els tractaments M-UVM-7 i M-UVM-7-NH<sub>2</sub>. Pel contrari, el tractament amb M-UVM-7-SH magnètic va preservar l'estabilitat del color inicial del suc de poma mesurat als 30 minuts de la retirada del material. A més a més, l'activitat antioxidant i el potencial fenòlic presentaren escasses pèrdues (<20%). Finalment, entre els mecanismes de neteja per a la reutilització dels nanomaterials, destaca l'aigua acidificada per la seua capacitat de neteja, senzillesa d'aplicació i característiques econòmiques obrint la possibilitat a la reutilització dels nanomaterials funcionalitzats.

PARAULES CLAU: PPO, enfosquiment enzimàtic, materials mesoporos de sílice magnètic, UVM-7, UVM-7-NH<sub>2</sub>, UVM-7-SH, suc de poma.

## ABSTRACT

Nowadays, fruits and vegetables are high demanded foods due to their health benefits. However, the enzymatic browning produced in these products by the polyphenol oxidase enzyme (PPO) entails a deterioration of their color as well as a loss of their nutritional value, which generates rejection by the consumer and consequently grand economic losses for food industry. This research studies the effect of magnetization of non-functionalized mesoporous silica materials (M-UVM-7) and functionalized with amines ((UVM-7-NH<sub>2</sub>) and with thiols (UVM-7-SH) on enzymatic browning, as well as on bioactive compounds (polyphenols, flavonoids, flavanols and antioxidant capacity) from apple juice. Finally, in order to reuse them, several cleaning strategies were studied. In general terms, it was observed how the phenolic potential of apple juice was reduced following the same trend as in the presence of PPO for M-UVM-7 and M-UVM-7-NH<sub>2</sub> treatments. However, M-UVM-7-SH treatment preserved the beginning colour stability of apple juice measured 30 minutes after the removal of material. In addition, antioxidant activity and phenolic potential presented few degradation (<20%). Finally, regarding cleaning mechanisms, acidified water highlights due to its cleaning capacity, its simplicity of application and its economic characteristics, opening the possibility of reusing functionalized nanomaterials.

KEY WORDS: PPO, enzymatic browning, magnetic mesoporous silica materials, UVM-7, UVM-7-NH<sub>2</sub>, UVM-7-SH, apple juice.

## 1. INTRODUCCIÓN

El contenido energético y nutricional de las frutas y hortalizas varía notablemente entre las diferentes especies, siendo productos muy recomendables debido a sus efectos saludables. Históricamente, este tipo de alimentos han sido muy importantes entre los consumidores gracias a sus altas concentraciones de vitaminas, especialmente vitaminas A y C; minerales y compuestos fitoquímicos que funcionan como antioxidantes, fitoestrógenos y agentes antiinflamatorios (Slavin y Lloyd, 2012). El color y sabor de las frutas, está determinado por los compuestos fenólicos que, además, están relacionados con la disminución del riesgo de sufrir enfermedades crónicas y degenerativas (Serra et al., 2021).

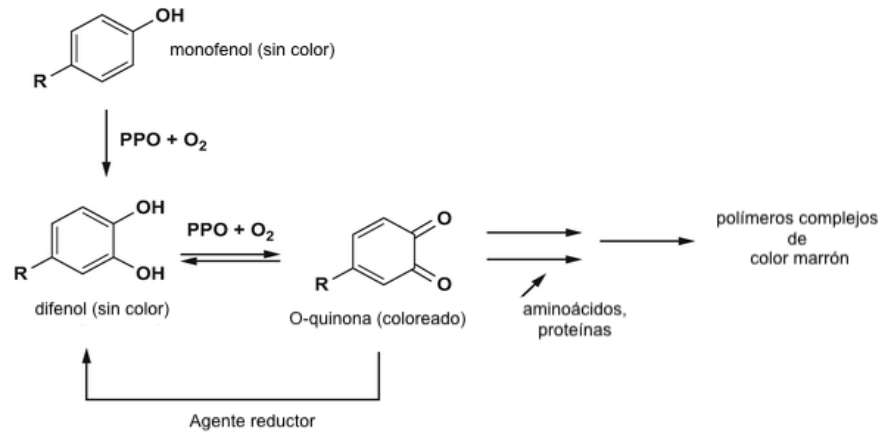
Todo lo anterior promueve una tendencia creciente hacia el consumo de frutas y vegetales frescos (71%), mientras que el 20% son productos procesados como los zumos (Dhyani et al., 2018). Dado que la apariencia y el color son atributos esenciales en frutas y verduras, para la aceptación por el consumidor, uno de los objetivos de la industria alimentaria es asegurar su estabilidad inicial (İyidoğan y Bayındırlı, 2004). En el caso de las frutas y verduras, el mecanismo responsable del cambio de color se conoce como pardeamiento enzimático y ocasiona importantes pérdidas económicas en la industria alimentaria. El tiempo de almacenamiento se ve reducido y en consecuencia su valor en el mercado (Farouk et al., 2020).

El pardeamiento enzimático se debe a la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO, EC 1.14.18.1 o EC 1.10.3.1) cuando reacciona con los compuestos fenólicos presentes en las frutas. Esta enzima, pertenece al grupo de las metaloproteínas al presentar en su centro activo dos iones de Cobre (II) unidos cada uno de ellos a tres histidinas (enzima cúprica de tipo III) (Muñoz-Pina et al., 2018). En las frutas y verduras, la enzima PPO se localiza en los plástidos, mientras que los compuestos fenólicos se encuentran en las vacuolas. De este modo, cuando el tejido parenquimático de las frutas se rompe, ambos, enzima y sustrato entran en contacto, dando lugar a dos reacciones enzimáticas diferentes (Serra et al., 2021). En primer lugar, la hidroxilación de los monofenoles para formar orto-fenoles (actividad cresolasa) y por otro lado la oxidación de estos orto-fenoles en quinonas (actividad catecolasa) (Muñoz-Pina et al., 2018) (Figura1). Posteriormente, se produce una reacción de polimerización no enzimática, donde las quinonas formadas, reaccionan rápidamente con otras quinonas, aminoácidos, proteínas y fenoles (Serra et al., 2021). Esta polimerización genera compuestos de color marrón o negro denominados melanoides, responsables del pardeamiento indeseable de los productos (Teribia et al., 2021).

Los principales factores que influyen en el pardeamiento enzimático son: la concentración de la enzima activa y de los compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la presencia de oxígeno (Whitaker, 1995). En consecuencia, el procesamiento de alimentos vegetales que presentan elevadas concentraciones de PPO y polifenoles, conlleva un elevado riesgo de pardeamiento enzimático debido al contacto entre estos compuestos tras la ruptura del tejido.

Para prevenir el pardeamiento y sus desventajas, la industria recurre a métodos térmicos como la pasteurización (Pongener et al., 2018). Sin embargo, el uso de temperaturas elevadas (60-90°C) afecta a los compuestos

termosensibles presentes en las frutas como las vitaminas, los carotenoides o los antocianos (Buckow et al., 2010). Otra estrategia preventiva es el uso de tratamientos químicos como la adición de agentes acidulantes para la disminución del pH o agentes quelantes que interactúan con el centro activo del enzima (Eidhin et al., 2010). Otros compuestos químicos utilizados son los sulfitos, si bien su uso ha sido restringido en alimentos y bebidas debido a su baja estabilidad y respuestas alérgicas (Rangan y Barceloux, 2009).



**FIGURA 1.** Reacción generalizada de la PPO. (Fuente: Jukanti, 2017).

Con el fin de evitar dichas desventajas, se han desarrollado otras estrategias para la inactivación de la PPO, por ejemplo, el uso de altas presiones hidrostáticas (HHP) (Juárez-Enríquez et al., 2015), que junto con la aplicación de temperaturas suaves permite conservar los compuestos termolábiles como las vitaminas. Por otro lado, también puede controlarse la actividad PPO con tratamientos que combinan ultrasonidos y ácido ascórbico (Jang y Moon, 2011), pulsos eléctricos (Meneses et al., 2013), o luz pulsada (Manzocco et al., 2013). Pese a los buenos resultados en la inactivación de la PPO, sus costes de implementación y requerimientos tecnológicos provocan un uso industrial poco extendido. Por otro lado, la ultrafiltración, se abre paso como nueva estrategia de retención de la PPO mediante membranas (Schmidt et al., 2016). Sin embargo, se puede producir la desnaturalización o agregación proteica en la superficie de las membranas provocando la pérdida de compuestos bioactivos y sólidos solubles. Esto, ocasiona cambios en las características fitoquímicas y organolépticas del producto, produciéndose el rechazo por el consumidor (Fernandez-Jalao et al., 2019).

Por otro lado, el desarrollo de la nanotecnología y en concreto de los nanomateriales es otra estrategia recientemente explorada. Los resultados obtenidos en esta área de investigación ofrecen diversas oportunidades en diferentes sectores como en medicina, reacciones catalíticas (Vallet-Regí et al., 2007) y de forma más incipiente en sectores de la industria alimentaria. En este último sector, la nanotecnología, se ha aplicado fundamentalmente en la encapsulación de compuestos bioactivos y en el diseño de envases inteligentes o de recubrimientos, con gran repercusión en la actualidad (Sun et al., 2017).

Dentro del amplio campo de los nanomateriales, los materiales mesoporosos de sílice son estructuras compuestas químicamente por dióxido de silicio (SiO<sub>2</sub>) con un diámetro de poro en el rango entre 2 y 50 nm (Narayan et al., 2018). Además, las partículas mesoporosas presentan una gran superficie específica

(> 700 m<sup>2</sup> / g) y un gran volumen de poros (> 0,6 cm<sup>3</sup> / g) (Zhang y Cresswell, 2016), su estructura silíceo proporciona estabilidad térmica y química, así como una menor toxicidad y, tiene bajo coste (Ghaferi et al., 2021). Todas estas características junto con su biocompatibilidad y versatilidad química permiten a estos materiales poder actuar como adsorbentes, matrices huésped y sensores e interactuar con diversos catalizadores y formar enlaces con ellos (Botella et al., 2012). Dentro de las partículas mesoporosas de sílice se encuentra el material UVM-7, el cual se caracteriza por presentar poros intra e inter-partícula. Esto le proporciona una importante área superficial y una distribución estable del poro, siendo óptimos para la interacción con enzimas (Ispas et al., 2009).

En trabajos anteriores (Muñoz-Pina et al., 2018; 2020), se comprobó que el material de sílice mesoporoso UVM-7 funcionalizado con aminas (-NH<sub>2</sub>) y tioles (-SH) detuvo el pardeamiento enzimático en zumo de manzana. Sin embargo, no se han realizado estudios de su influencia sobre los compuestos bioactivos presentes en el zumo ni sobre posibles estrategias de recuperación, limpieza y reutilización del material. Con el fin de explorar este último aspecto de su aplicación, se ha planteado la magnetización del material UVM-7 para lograr su separación del medio, y de esta forma estudiar su recuperación y posterior reutilización.

Por tanto, el objetivo de este estudio es analizar el efecto de la magnetización del UVM-7 funcionalizado con grupos tiol y aminas sobre la capacidad inhibitoria de la PPO y sobre los compuestos bioactivos presentes en zumo de manzana recién licuado. Además, se plantean y analizan posibles estrategias de limpieza y reutilización de los materiales utilizados.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales**

Las determinaciones analíticas del zumo de manzana, se han hecho utilizando los siguientes reactivos: catecol, quercitina, trolox, ácido gálico, nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>), tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>), hidróxido de sodio (NaOH), ácido L-Ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), Folin-Ciocalteu, ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), dihidrogenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), oxalato de sodio (Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), metanol (CH<sub>4</sub>O), TPTZ (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid) fueron adquiridos por Sigma Aldrich ®. Acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), tricloruro de hierro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) fueron proporcionados por Honeywell Fluka™. Sodio carbonato anhidro (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ácido clorhídrico (HCl), hidrogenofosfato de disodio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) fueron proporcionados por Scharlab. Ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) se obtuvo de Pancreac. Los materiales utilizados M-UVM-7, M-UVM-7-SH y M-UVM-7-NH<sub>2</sub> fueron previamente sintetizados y caracterizados por el grupo de trabajo. Para los ensayos se elaboró zumo recién licuado de manzanas (cv. Golden Delicious) obtenidas en una tienda local.

## 2.2 Preparación de zumo de manzana y caracterización

La extracción del zumo de manzana se realizó mediante licuadora Molinex Centrifugal JV200045. Inmediatamente después se procedió a la caracterización del zumo.

### 2.2.1 DETERMINACIÓN DEL PH Y DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (°BRIX)

El pH del zumo de manzana fue medido con un pHmetro digital (Delta 320 pH meter, Mettler Toledo Instruments (Shanghai) Co., Ltd., China). Las medidas, se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

Los sólidos solubles totales, expresados como °Brix, de las muestras se determinaron a la misma temperatura que los demás ensayos, temperatura ambiente  $25 \pm 1$  °C, utilizando un refractómetro de sobremesa (Atago 3T, Japan). Todas las medidas se realizaron por triplicado y el prisma del refractómetro fue lavado con agua destilada después de cada análisis.

### 2.2.2 DETERMINACIÓN DEL COLOR

El pardeamiento enzimático se evaluó a partir del cambio de color de las muestras del licuado de manzana utilizando un espectrofotómetro Minolta (Spectrophotometer CM-3600 d, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan). Los valores de color fueron expresados según el sistema CIE  $L^*a^*b^*$ . La diferencia total de color  $AE^*_{ab}$  fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$AE^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

Donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ , han sido calculados en referencia al zumo de manzana no tratado. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

### 2.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES, FLAVONOLES Y POLIFENOLES TOTALES

El contenido total de flavonoides fue analizado por el método descrito por Abid et al., 2013, con modificaciones. En resumen, 100  $\mu$ L de muestra de zumo de manzana se mezclaron con 1.45 mL de agua Milli-Q y 75  $\mu$ L de nitrito de sodio 5%. Tras 6 minutos de incubación a temperatura ambiente  $25 \pm 1$ °C, se añadieron 150  $\mu$ L de tricloruro de aluminio 10%. Posteriormente, se dejaron transcurrir 5 minutos más y se añadieron 500  $\mu$ L de hidróxido de sodio 1 M. La absorbancia se midió a 510 nm mediante el uso de un espectrofotómetro de sobremesa Beckman Coulter (DU 730, Life Science UV/Vis Spectrophotometer, USA). Se realizaron las medidas por triplicado y los resultados se expresaron en mg de (+)- catequina equivalente por litro de muestra, utilizando una curva estándar de 0-600 mg/L de catequina.

El contenido total de flavonoles se determinó según el método descrito por Abid et al., 2013. Para ello, se cogió una alícuota de 100  $\mu$ L de zumo de manzana y se mezcló con 500  $\mu$ L de tricloruro de aluminio al 2%, 750  $\mu$ L de acetato de sodio 50 g/L y 250  $\mu$ L de agua Milli-Q hasta completar un volumen

de 2 mL. La mezcla se dejó reposar durante 150 minutos a 20°C y se midió la absorbancia a 440 nm con un espectrofotómetro de sobremesa Beckman Coulter (DU 730, Life Science UV/Vis Spectrophotometer, USA). Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de quercetina equivalente por litro de muestra. Previamente se realizó una curva estándar de calibración utilizando quercetina como patrón (0-160 mg/L).

El contenido de polifenoles totales se determinó con modificaciones del protocolo establecido por Waterhouse, 2002. En primer lugar, se preparó una disolución de carbonato de sodio, a partir de la adición de 200 g de sodio carbonato anhidro a 800 mL de agua Milli-Q. Se sometió la disolución a ebullición con agitación constante. A continuación, se dejó enfriar la mezcla durante 24 horas y se filtró para eliminar los cristales formados. Después, se completó con agua pura hasta un volumen total de 1L. A continuación, se adicionó a un eppendorf un volumen de zumo de manzana de 10 µL, 1.58 mL de agua pura Milli-Q, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (FC). Esta mezcla, adquirió una coloración amarilla. Tras una espera de 3 minutos, se añadieron 300 µL de la disolución de carbonato de sodio previamente preparada, este soluto provocó un cambio de color a azul. Por último, se dejaron reposar las disoluciones durante 60 minutos a 30°C y se midió la absorbancia, por triplicado, a 765 nm. Los resultados obtenidos, se expresaron en mg/L de ácido gálico equivalente a partir de una recta de calibrado de 0-500 mg/L.

## **2.3 Determinación de la capacidad antioxidante del zumo de manzana**

### **2.3.1 ENSAYO ABTS**

El ensayo de ABTS, también conocido como ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (Opitz et al., 2014), se realizó siguiendo el procedimiento establecido por Thaipong et al., 2006, con determinadas modificaciones. Se parte de dos disoluciones stock de ABTS<sup>•+</sup> 7,4 mM y persulfato de potasio 2.6 mM. La disolución de trabajo se preparó a partir de la mezcla de estas disoluciones stock y a continuación, se dejó que reaccionasen durante 12 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Para establecer si la mezcla se ha realizado correctamente, se añade a 1 mL de la disolución de trabajo (ABTS<sup>•+</sup> y persulfato de potasio), 60 mL de metanol y se mide la absorbancia, mediante el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. El resultado debe estar alrededor de  $1,1 \pm 0,02$  unidades. Para cada ensayo, se mezclan 150 µL de licuado de manzana variedad Golden Delicious con 2850 µL de la disolución de trabajo. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en mg de trolox equivalente/L, a partir de una curva estándar lineal entre 0-140 mg de trolox equivalente/L.

### **2.3.2 ENSAYO FRAP**

El ensayo FRAP (poder antioxidante reductor férrico), se realizó según Thaipong et al., 2006, con pequeñas modificaciones. Previamente se prepararon diferentes disoluciones stock tampón acetato 300 mM a pH 3.6, 10 mM de solución TPTZ en 40 mM de ácido clorhídrico, y 20 mM de solución de tricloruro de hierro hexahidratado. La disolución de trabajo (FRAP), se preparó mezclando



25 mL de tampón acetato, 2.5 mL de la solución TPTZ y 2,5 mL de la disolución de tricloruro de hierro hexahidratado. Previamente a ser utilizado, se mantuvo a 37°C hasta que la disolución alcanzó una temperatura homogénea. Para el ensayo, se cogió una alícuota de 150 µL del zumo y se mezcló con 2850 µL del reactivo FRAP dejándolo reposar durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se midió en un espectrofotómetro de sobremesa Beckman Coulter (DU 730, Life Science UV/Vis Spectrophotometer, USA) el producto coloreado (complejo de tripiridiltriazina ferrosa) a una longitud de onda de 593 nm. Los resultados fueron expresados en mg de trolox equivalente/Litro, a partir de una curva estándar lineal entre 0-500 mg de Trolox equivalente/L. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

### 2.3.3 ENSAYO DPPH

El ensayo cuantitativo para establecer la cantidad de actividad de los radicales libres de DPPH fue llevado a cabo por el método descrito por Liao et al., (2018). Se mezclaron 300 µL de zumo de manzana Golden Delicious con 700 µL de la solución de DPPH (previamente preparada con 200 µM de metanol). La mezcla fue incubada durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se determinó a 517 nm mediante un espectrofotómetro de sobremesa Beckman Coulter (DU 730, Life Science UV/Vis Spectrophotometer, USA) y se realizó por triplicado para cada muestra. Los resultados se expresaron mediante una recta de calibrado en mg de trolox equivalente/Litro, a partir de una curva lineal estándar entre 0-200 mg de trolox equivalente/L.

### 2.4 Determinación de ácido L-ascórbico

Para determinar el contenido de ácido L-ascórbico o vitamina C, se siguió el protocolo descrito por Selimovic et al., 2011. Para ello, se preparó una solución tamponada a pH 5.4 a partir de la mezcla de dihidrogenofosfato de potasio 0.03M e hidrogenofosfato de disodio dihidrato  $8,99 \times 10^{-4}$  M. A continuación, se preparó una solución de oxalato de sodio (0,0056 M) en la solución previa tamponada a pH 5.4. Posteriormente, 50 µL de zumo se mezclaron con 1.95 mL de la solución de oxalato de sodio y se midió su absorbancia a 266 nm en cubetas de cuarzo por triplicado, mediante un espectrofotómetro de sobremesa Beckman Coulter (DU 730, Life Science UV/Vis Spectrophotometer, USA). Los resultados, se expresaron en mg de ácido ascórbico/100 mL de zumo siguiendo la recta estándar 0-12 mg/100 mL de ácido ascórbico.

### 2.5 Determinación de la actividad enzimática de la PPO

La actividad enzimática de la PPO del zumo se analizó siguiendo el protocolo descrito por Illera et al., 2019. Para ello, se mezclaron 100 µL de zumo de manzana con 2.9 mL de la solución sustrato. La solución, fue preparada con catecol 0.05 M en tampón fosfato 0.1 M a pH 6.5. Para determinar la actividad enzimática de la polifenoloxidasas a través de la oxidación de los compuestos fenólicos a lo largo del tiempo, se midió la absorbancia a 420 nm cada 10 segundos a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. A partir de la curva

resultante (absorbancia vs tiempo), se determinó la pendiente del tramo lineal inicial relacionado con la velocidad inicial de la reacción.

## **2.6 Determinación del ratio óptimo material/zumo**

Por otro lado, se determinó el ratio óptimo material/zumo (mg/mL) analizando la actividad de la PPO en presencia de distintas cantidades de los materiales mesoporosos. Se probaron diferentes ratios (15/1, 15/0.5 y 15/0.25) manteniendo constante la cantidad de material (15 mg) y variando la cantidad de zumo (mL). La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 min y posteriormente se realizaron de igual modo los ensayos de caracterización previamente descritos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## **2.7 Tratamiento del zumo con los materiales mesoporosos magnetizados**

Para cada ensayo de caracterización, se utilizó una alícuota de 2 mL de zumo de manzana recién exprimido y se mezcló con 15 mg de nanomaterial (M-UVM-7, M-UVM-7-SH y M-UVM-7-NH<sub>2</sub>). Estas mezclas, se mantuvieron en agitación durante 10 minutos. Este tiempo de contacto entre el material y el zumo se decidió en base a un ensayo preliminar en el cual se analizó la evolución de la actividad enzimática de la PPO del zumo recién exprimido con el tiempo. Obteniéndose la máxima actividad de la enzima PPO a los 10 minutos posteriores de la elaboración del zumo.

Posteriormente, el material se retiró mediante un imán de neodimio y la muestra se mantuvo en agitación durante 30 minutos más. Todos los ensayos de caracterización realizados en el zumo de manzana recién exprimido se llevaron a cabo con el zumo tratado con los nanomateriales. Se tomaron alícuotas antes y después de retirar el material y después de 30 minutos en agitación tras la extracción del material. Así, se comprobaba la posible existencia de un efecto de recuperación de la actividad enzimática. Las medidas se realizaron por triplicado y se utilizó como control una muestra sin material. Además, también se midió un blanco con los inhibidores.

## **2.8 Limpieza de los materiales funcionalizados**

Para poder reutilizar los materiales, se abordaron tres estrategias de limpieza basadas en la metodología descrita por Yu et al., 2018 con modificaciones. En primer lugar, se suspendieron 70 mg de material en 15 mL de agua miliQ, y se dejó en agitación durante 30 minutos a 50°C en una cámara termostataada (J.P. Selecta, s.a Rotabit (Spain)). En segundo lugar, se siguió el mismo protocolo, pero añadiendo ácido acético (1:10), consiguiendo así un pH aproximado de 2.5. Por último, se estudió si el efecto de los ultrasonidos favorecería la limpieza, para ello la mezcla acidificada fue sometida a un baño de ultrasonidos termostatado a 50 °C durante 30 minutos (P.Selecta Ultrasons (Spain))

Finalmente, el material fue retirado magnéticamente y lavado 2 veces con agua. Posteriormente, se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5804R) las muestras a 9250 rpm durante 10 minutos. El sólido obtenido se secó en estufa a 50°C. Una vez el material estuvo seco, se determinó por medio de isotermas

de adsorción/desorción de N<sub>2</sub> el área superficial, volumen de poro y la distribución de tamaño de poro (Micromeritics ASAP 2020).

## 2.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico de varianza (ANOVA) simple y la prueba de múltiples rangos mediante el procedimiento LSD (diferencia mínima significativa) de la prueba de Fisher con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa Statgraphics Centurion 64. Además, los datos fueron sometidos a un análisis de correlación de Pearson para encontrar la relación lineal entre variables. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95% (valor de  $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Influencia del ratio material:zumo en la capacidad de inhibición del material

Dado que un punto esencial en la inhibición del pardeamiento enzimático por la acción de los nanomateriales funcionalizados con grupos tiol (-SH) o aminas (-NH<sub>2</sub>) es la relación enzima/material (Muñoz et al.,2018), se realizó un estudio para conocer el ratio óptimo. Para ello se determinó la actividad residual de la PPO variando el ratio material:zumo (0, 15, 30 y 60 mg/mL) (tabla 1). En este sentido se consideró que la actividad de la polifenoloxidasasa en el zumo de manzana sin tratamiento con material (ratio 0) para cada tiempo fue del 100%.

Como se refleja en la tabla 1, la actividad enzimática registrada en los zumos tratados se reduce cuanto mayor es el ratio material:zumo. Tal y como se recoge en la literatura (Muñoz et al.,2018), cuanto mayor es la cantidad de material por polifenoloxidasasa, mayor será la inhibición. Además, se observó que mientras que el zumo tratado con el material no funcionalizado no presentó diferencias significativas de actividad en función del tiempo y ratio, los tratados con tioles y aminas sí las presentaron.

La presencia de los nanomateriales funcionalizados con aminas y tioles, antes de ser eliminados del medio, otorgaron mayor capacidad de inhibición sobre la PPO. En presencia de los materiales mencionados previamente, se observó que mientras que con el material M-UVM-7-NH<sub>2</sub> no se alcanzó el 50% de inhibición para ninguno de los tres ratios estudiados, con el M-UVM-7-SH sí que se observó hasta un 62% de inhibición. Además, se vio que el zumo tratado con el material funcionalizado con grupos tiol tuvo una variación de actividad enzimática que osciló desde el 67% al 38% para el ratio 15 y 60, respectivamente (tabla 1). Esto podría deberse al aumento del ratio de grupos tioles por cantidad de PPO que se consigue con ratios mayores de material:zumo, generando así un aumento de enzima inhibida. Por otro lado, se observó que, tras la retirada del material, la actividad de la polifenoloxidasasa experimentó una reducción significativa en los zumos tratados con M-UVM-7-SH y M-UVM-7-NH<sub>2</sub>. Parece ser que estos materiales no solo son capaces de inhibir la actividad de la enzima, sino que son capaces de adsorberla o inmovilizarla en su superficie (Ansari y Husain, 2012) de manera que al retirar

magnéticamente el material del medio se retira asimismo parte de la enzima presente en el medio. Además, en el caso del zumo tratado con M-UVM-7-SH, se observó una disminución muy significativa en la actividad enzimática. Estos resultados revelan que el material M-UVM-7-SH podría no solo otorgar una mayor inhibición sobre la enzima respecto a los otros tratamientos, sino que es capaz de retener la PPO tanto activa como inactiva en su superficie. De este modo, al retirar el material del medio, se eliminaría gran parte de la enzima presente en el zumo, dando lugar a un aumento de la inhibición para el tratamiento con tioles.

**TABLA 1.** Registros de la actividad polifenoloxidasasa (%) para diferentes ratios material:zumo y a distintos tiempos (10 y 30 minutos).

material	ratio material:zumo (mg/mL)	Actividad PPO (%)		
		10	10*	30*
M-UVM-7	0	100±2	100±4	100±2
	15	100 ± 4 <sup>aA</sup>	98 ± 5 <sup>aA</sup>	95 ± 2 <sup>aA</sup>
	30	91 ± 5 <sup>aA</sup>	97 ± 5 <sup>aA</sup>	98 ± 6 <sup>aA</sup>
	60	95 ± 2 <sup>aA</sup>	98 ± 2 <sup>aA</sup>	100 ± 2 <sup>aA</sup>
M-UVM-7-SH	0	100±3	100±2	100±2
	15	67 ± 4 <sup>aA</sup>	32 ± 5 <sup>cA</sup>	41 ± 2 <sup>bA</sup>
	30	45 ± 4 <sup>aB</sup>	32 ± 7 <sup>bA</sup>	45 ± 6 <sup>aA</sup>
	60	38 ± 3 <sup>aC</sup>	31 ± 6 <sup>aA</sup>	39 ± 2 <sup>aA</sup>
M-UVM-7-NH <sub>2</sub>	0	100±3	100±1	100±2
	15	89 ± 8 <sup>aA</sup>	86 ± 6 <sup>aA</sup>	91 ± 6 <sup>aA</sup>
	30	72 ± 2 <sup>aC</sup>	66 ± 2 <sup>bB</sup>	70 ± 2 <sup>abB</sup>
	60	77 ± 2 <sup>aB</sup>	63 ± 2 <sup>bC</sup>	65 ± 2 <sup>bC</sup>

\*Tras la retirada del material después de haber estado en contacto con el zumo de manzana recién exprimido. <sup>a-c</sup> Las distintas letras minúsculas indican diferencias significativas para cada tiempo y condición (presencia/ausencia del material) haciendo referencia a un mismo ratio para un p-valor<0.05, comparándolas con el valor de actividad PPO registrado a tiempo 10 minutos en presencia del material. <sup>A-C</sup> Las letras mayúsculas, hacen referencia a las diferencias significativas entre los distintos ratios utilizados para el mismo tiempo y condición, para un p-valor<0.05.

Por tanto, en base a los resultados recogidos en la tabla 1, podría establecerse que el material mesoporoso M-UVM-7-SH es el más eficaz para la inhibición del pardeamiento enzimático. Se decidió escoger el ratio 15 mg/mL para optimizar los gastos económicos del material.

### 3.3 Efecto del tratamiento sobre los compuestos de interés del zumo de manzana

Las manzanas (*Malus X domestica*), son una importante fuente de compuestos fenólicos como ácidos hidroxicinámicos, 3-flavanoles/procianidinas, flavonoles y dihidrocalconas (Dhyani et al., 2018). Estas altas concentraciones de polifenoles pueden verse afectadas por la acción de la PPO durante el pardeamiento enzimático. Para determinar el efecto de los

nanomateriales sobre estos compuestos bioactivos, se realizaron diferentes estudios antes y después de los respectivos tratamientos.

### 3.3.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE EL PH, SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (°BRIX), COLOR Y ÁCIDO L- ASCÓRBICO

El impacto del tratamiento con los distintos materiales sobre el pH, los sólidos solubles totales, cambios de color y contenido en vitamina C se muestran en la tabla 2.

**TABLA 2.** Valores de pH, sólidos solubles totales, diferencia de color y contenido de ácido L-ascórbico de zumo de manzana en función del material y el tiempo de tratamiento.

Muestra	Tiempo (min)	pH	Sólidos solubles totales (°Brix)	$\Delta E_{ab}^*$	Ácido ascórbico (mg/100mL)
Control	0	3.99 ± 0.01 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	22.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
	10	3.99 ± 0.01 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.24 ± 0.08 <sup>bA</sup>	21.0 ± 0.4 <sup>bA</sup>
	30	4.01 ± 0.01 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.6 <sup>aA</sup>	17.5 ± 1.8 <sup>cAB</sup>
M-UVM-7-SH	0	3.96 ± 0.03 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	21 ± 2 <sup>aA</sup>
	10	3.97 ± 0.03 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.03 <sup>bC</sup>	22 ± 2 <sup>aA</sup>
	30	3.96 ± 0.01 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>aB</sup>	22 ± 2 <sup>aA</sup>
M-UVM-7-NH <sub>2</sub>	0	5.57 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	20 ± 2 <sup>abA</sup>
	10	5.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.4 ± 0.01 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.3 <sup>bB</sup>	18 ± 2 <sup>bB</sup>
	30	5.57 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.01 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.6 <sup>aA</sup>	15 ± 2 <sup>bB</sup>
M-UVM-7	0	4.13 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.1 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	20 ± 2 <sup>abA</sup>
	10	4.01 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.7 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.80 ± 0.08 <sup>bA</sup>	21 ± 2 <sup>aAB</sup>
	30	4.05 ± 0.02 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	13.3 ± 0.07 <sup>aA</sup>	17 ± 1 <sup>bAB</sup>

.<sup>a-c</sup>Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre los diferentes tiempos para un p-valor<0.05 comparándolo con el control t=0. <sup>A-C</sup> Las letras mayúsculas representan las diferencias significativas entre los diferentes compuestos para un mismo tiempo para un p-valor<0.05; en este caso el tiempo 10 y 30 se comparan con el t=10 de la muestra control.

Tal y como se desprende de los resultados, el pH de los zumos no se vio afectado por el tratamiento con los materiales M-UVM-7 y M-UVM-7-SH respecto al control, manteniéndose en todos los casos un valor de pH acorde a la literatura (3.99±0.02) (Abid et al., 2013). No obstante, sí se observó un aumento significativo en el valor de pH en el zumo tratado con el material M-UVM-7-NH<sub>2</sub>, llegando a alcanzar un pH por encima a 5.5. Esto podría deberse a la gran cantidad de grupos amino unidos a la superficie de las partículas, los cuales pueden modificar el pH del zumo aumentando significativamente su valor.

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas respecto al contenido en sólidos solubles totales de los zumos tras aplicar los diferentes tratamientos, con valores similares a la literatura (10.1±0.1) (Xiang et al.,2020).

En referencia al cambio de color producido por el pardeamiento enzimático, se observó como el zumo de manzana sin tratar experimentó un cambio de color significativo en tan solo 10 minutos llegando a una diferencia de color de 12 a los 30 minutos. Este cambio de color no se consiguió frenar en los zumos tratados con los M-UVM-7 y M-UVM-7-NH<sub>2</sub> los cuales pardearon de forma

similar a la muestra control. Estos resultados se corresponden con lo obtenido en la tabla 1, ya que los valores de disminución de la actividad enzimática para el ratio 15 de ambos materiales fueron muy bajos. Por el contrario, el zumo tratado con el material M-UVM-7-SH, presentó una diferencia de color menor al 80% respecto al zumo recién licuado, manteniendo una diferencia del 70% a los 30 minutos. Por tanto, según los datos obtenidos, puede decirse que el material funcionalizado con tioles fue capaz de detener en gran medida el pardeamiento enzimático del zumo de manzana.

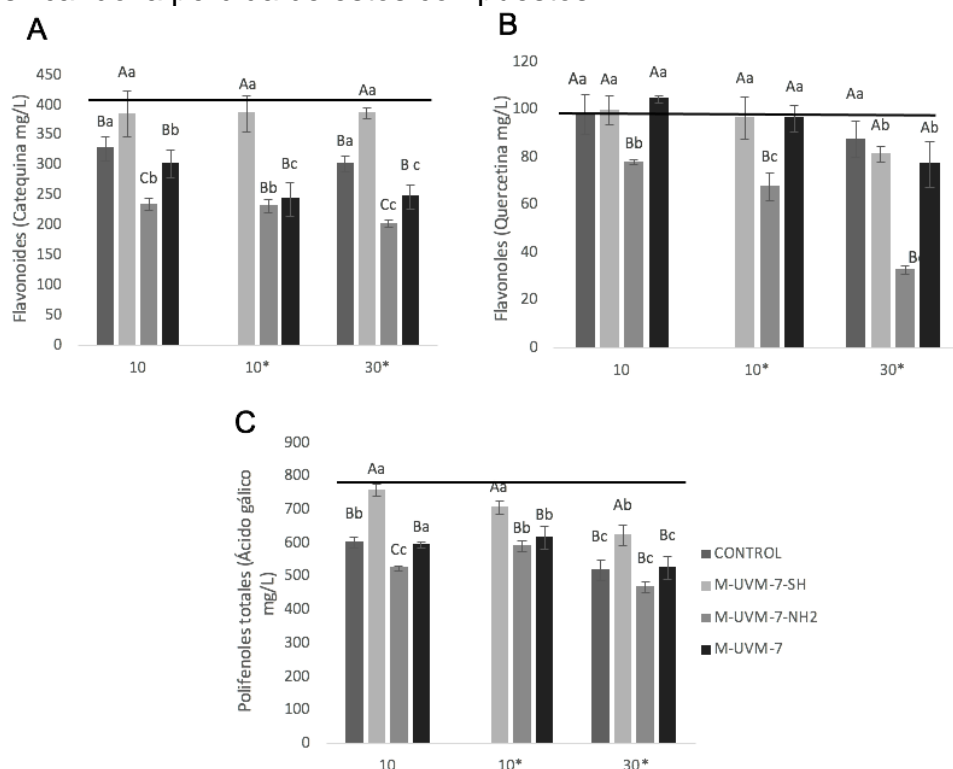
Por otro lado, a pesar de que las manzanas no son consideradas como una fuente de vitamina C, las dosis de ácido L-ascórbico varían desde 3 a 30 mg/100mg según la variedad y maduración (Kolniak-Ostek et al., 2013). En este caso, se obtuvieron valores de vitamina C de 22.5 mg por 100 mL de zumo de la variedad Golden Delicious. Sin embargo, esta alta concentración disminuyó con el transcurso del tiempo, produciéndose una pérdida significativa de vitamina C (de 22.5 a 17.5 mg/100 mL) debido al proceso de oxidación. Esta tendencia de disminución del contenido en vitamina C quedó reflejada de igual modo en el zumo tratado con el material sin funcionalizar (M-UVM-7). Dicha pérdida se vio más acusada tras el tratamiento con el soporte M-UVM-NH<sub>2</sub> llegando a obtener tan solo 15 mg/100 mL de vitamina C al final del ensayo. Quizás, este cambio se deba a que a pesar de que M-UVM-7-NH<sub>2</sub> sea capaz de inhibir la PPO, la enzima residual está a un pH mayor, teniendo más actividad enzimática y actuando en consecuencia sobre los compuestos antioxidantes del zumo (Muñoz et al., 2018). Además, cuando se eliminó el M-UVM-NH<sub>2</sub> del zumo se detectó una disminución leve pero significativa en la cantidad de vitamina C. Por el contrario, esta tendencia se vio frenada tras el tratamiento con M-UVM-7-SH, donde se observó que el contenido de ácido L-ascórbico se mantuvo estable significativamente con el paso del tiempo, manteniendo los valores del zumo recién licuado. Estos resultados estarían acordes con lo observado en el cambio de color, donde al haber menos pardeamiento enzimático habría menor oxidación de compuestos fenólicos.

### 3.3.2 INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO EN EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES, FLAVONOLES Y POLIFENOLES TOTALES

El contenido inicial de flavonoides en el zumo de manzana recién licuado fue de 401.26 mg/L lo cual concuerda con los datos reportados por otros autores (Abid et al., 2013). Sin embargo, este contenido inicial se redujo en un 20% tan solo con 10 minutos de contacto con el material sin funcionalizar y funcionalizado con aminas. Por el contrario, el material funcionalizado con tioles, sí impidió la oxidación, observándose a los 10 minutos un valor de 385.06 mg/L sin diferencias significativas con respecto al zumo recién licuado. Este nivel de flavonoides, se mantuvo a los 30 minutos tras el tratamiento, presentando para este tiempo diferencias significativas tanto con la muestra control como con los zumos tratados con los otros materiales. Por tanto, M-UVM-7-SH, sería la opción más interesante para mantener el mayor potencial flavonoico del zumo.

Por otro lado, el contenido total de flavonoles (97.83 mg/L) en el zumo fue notablemente inferior al contenido de flavonoides (Fig.6B), debido a que estos son un subtipo de flavonoides. Los valores obtenidos concuerdan con el rango establecido en la literatura 20-70 mg/L de quercetina equivalente en zumo de

manzana (Hollman y Arts, 2000). Sin embargo, a diferencia de los flavonoides, no se encontraron cambios significativos en estos compuestos a lo largo del tiempo. Resultados similares se obtuvieron en los diferentes zumos, a excepción del tratado con M-UVM-7-NH<sub>2</sub> que presentó diferencias significativas desde los 10 minutos de reacción. Este material parece que afecta negativamente, intensificando la pérdida de estos compuestos.



**FIGURA 6.** Evolución de los compuestos fenólicos en zumo de manzana fresco con diferentes tratamientos con nanomateriales. \*Después de retirar el material tras 10 minutos en contacto con el zumo de manzana recién exprimido. <sup>a-c</sup> Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre tiempos para un p-valor<0.05 comparándolo con el control t=0. <sup>A-C</sup> Las letras mayúsculas representan las diferencias significativas entre los diferentes compuestos para un mismo tiempo para un p-valor<0.05; en este caso el tiempo 10 y 10\* (antes y después de retirar el material) se comparan con el t=10 de la muestra control.

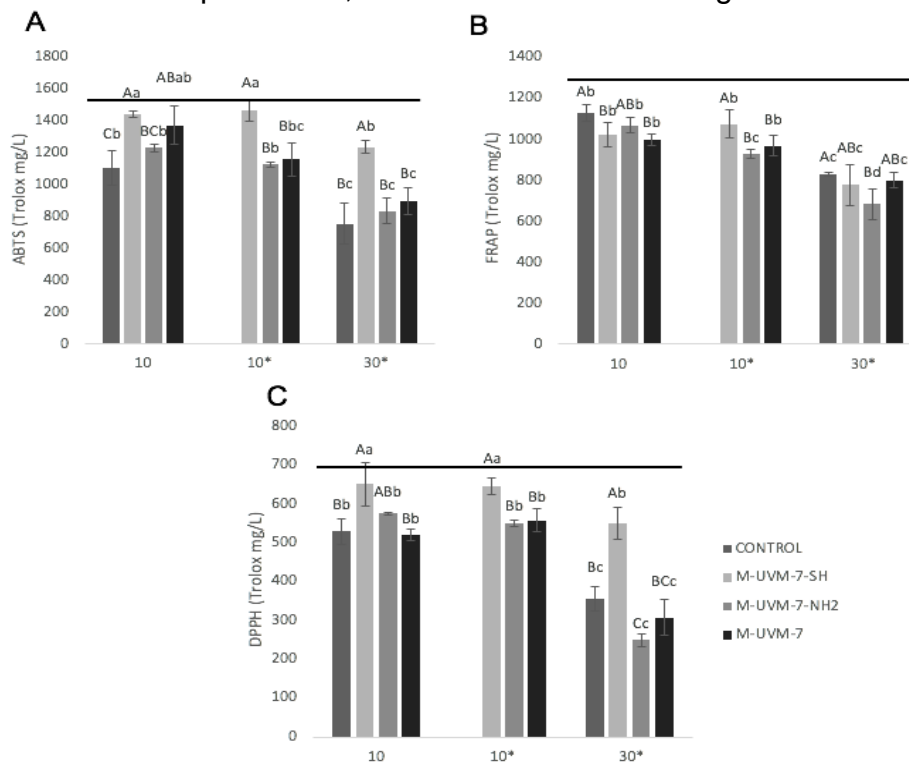
Por último, respecto a los polifenoles totales en zumo de manzana sin tratar (figura 6C) se obtuvieron valores iniciales de 707.40 mg de GAE/L en concordancia con la bibliografía (Marszałek et al., 2018). En este caso, la oxidación afectó rápida (10 minutos) y significativamente a los polifenoles, reduciendo su valor hasta 600 mg/L y hasta 500mg/L en 30 minutos. No se encontraron diferencias significativas para los zumos tratados con M-UVM-7 ni para M-UVM-7-NH<sub>2</sub> con respecto al control. Sin embargo, cuando el zumo se trató con M-UVM-7-SH, la pérdida del contenido total de polifenoles se vio reducida, mejorando el valor final en un 20% con respecto al control.

Por tanto, los contenidos de flavonoides, flavonoles y compuestos fenólicos totales se redujeron con el tiempo por la acción de la PPO del zumo de manzana. El tratamiento que presentó un efecto más negativo sobre los compuestos fenólicos fue el M-UVM-7-NH<sub>2</sub> debido a la menor estabilidad de estos ante el incremento de pH (Friedman y Jürgens,2000). Sin embargo, cuando se trató el zumo con M-UVM-7-SH, se observaron valores superiores de estos compuestos respecto al control y en algunos casos sin diferencias significativas con el

contenido inicial. Esto conlleva una mejora en la calidad de producto en referencia a sus propiedades biológicas (Pavun et al.,2018).

### 3.3.3 INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DE MANZANA

Las medidas de actividad antioxidante basadas en los métodos de DPPH, ABTS y FRAP revelaron una elevada actividad antioxidante en el zumo de manzana (figura 7). Sin embargo, con el tiempo se registraron pérdidas de entre 50-90% como resultado de la oxidación (Kolniak-Ostek et al., 2014). Los valores obtenidos según el método ABTS (figura 7A) fueron similares a los obtenidos por el grupo de trabajo Viera et al., 2012. Comparando el efecto de los distintos tratamientos, se observó que el zumo tratado con M-UVM-7-SH fue el que experimentó menos reducción (17.1%) a los 30 min en comparación con el control (49.4%). Sin embargo, los zumos tratados con M-UVM-7 y M-UVM-7-NH<sub>2</sub> se comportaron significativamente igual al zumo de manzana sin tratar, siguiendo la tendencia previa. Estos resultados se observaron también para la capacidad antioxidante medida mediante DPPH. En este caso, los valores iniciales fueron cercanos a 700 mg Trolox /L (Markowski et al.,2007) justo después de licuar la manzana sufriendo una disminución significativa del contenido final a los 30 minutos (350 mg Trolox /L). En este caso, el tratamiento del zumo con M-UVM-7-SH volvió a ralentizar la pérdida de la capacidad antioxidante medida por DPPH, manteniéndolo en 550 mg Trolox /L.



**FIGURA 7.** Evolución de la actividad antioxidante en zumo de manzana fresco con diferentes tratamientos con nanomateriales. \*Después de retirar el material tras 10 minutos en contacto con el zumo de manzana recién exprimido.<sup>a-c</sup> Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre los diferentes tiempos para un p-valor<0.05 comparándolo con el control t=0.<sup>A-C</sup>Las letras mayúsculas representan las diferencias significativas entre los diferentes compuestos para un mismo tiempo para un p-valor<0.05; en este caso el tiempo 10 y 10\* (antes y después de retirar el material) se comparan con el t=10 de la muestra control.



Finalmente, la actividad antioxidante inicial medida por la metodología FRAP arrojó valores cercanos a 1200 mg de Trolox /L. En este caso, los materiales no consiguieron reducir la capacidad antioxidante medida por FRAP, manteniendo unos valores significativamente iguales a la muestra control a los 30 minutos. Además, se observó como otra vez, el material funcionalizado con grupos aminas volvió a influir negativamente en la calidad del zumo, presentando el contenido más bajo en cuanto a capacidad antioxidante se refiere.

En base a los resultados obtenidos, se observa la tendencia de los grupos -SH en mantener o disminuir la pérdida de la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos del zumo de manzana. Por lo que se podría pensar que ejercen una mayor acción de inactivación de la PPO, frenando así, el pardeamiento enzimático.

### 3.4 Correlación entre los compuestos bioactivos del zumo y el pardeamiento enzimático

Por último, se analizaron las posibles correlaciones entre los diferentes compuestos estudiados y el pardeamiento enzimático. La tabla 3 muestra los coeficientes de correlación de Pearson.

**TABLA 3.** Correlaciones de Pearson entre los diferentes compuestos bioactivos del zumo control.

	ABTS		DPPH		FRAP		PT		Flavonoides		Flavonoles		Vit. C		$\Delta E_{ab}^*$	
DPPH	0,94		0,94		0,94		0,84		0,95		0,34		0,39		-0,79	
FRAP	0,94		0,94		0,94		0,84		0,95		0,34		0,39		-0,79	
PT	0,92		0,88		0,84		0,84		0,95		0,34		0,39		-0,79	
Flavonoides	0,82		0,91		0,72		0,95		0,95		0,34		0,39		-0,79	
Flavonoles	0,27		0,51		0,4		0,47		0,34		0,34		0,39		-0,79	
Vitamina C	0,81		0,87		0,9		0,76		0,79		0,39		0,39		-0,79	
$\Delta E_{ab}^*$	-0,93		-0,93		-0,87		-0,9		-0,94		-0,22		-0,22		-0,79	
Tiempo	-0,94		-0,97		-0,98		-0,87		-0,81		-0,5		-0,5		-0,94	
																0,89

La intensidad de correlación se distribuye en un rango entre -1 y 1. Los valores en rojo indican que no existe correlación significativa y en negro que sí la hay.

Como cabría esperar, el paso del tiempo está relacionado con un aumento de color por el proceso oxidativo para  $p < 0.05$  ( $r = 0.88$ ) y en consecuencia con una pérdida significativa de actividad antioxidante, compuestos fenólicos y vitamina C para  $p < 0.05$  ( $r = 0.97$ ,  $r = 0.87$  y  $r = 0.94$ ) acorde a lo registrado en la literatura (López-Nicolás et al., 2007). La actividad antioxidante se atribuye en mayor medida a los flavonoides (proantocianinas y catequinas) con una débil correlación para los glicósidos de quercetina (flavonoles) (Arora et al., 2018). Estas correlaciones se mantuvieron en los zumos tratados con M-UVM-7 y M-UVM-7-NH<sub>2</sub>. Sin embargo, el escaso pardeamiento enzimático sufrido en el zumo tratado con el material mesoporoso M-UVM-7-SH provocó que las correlaciones entre los diferentes compuestos se vieran reducidas. Siendo la capacidad antioxidante, la vitamina C y los polifenoles totales (PT) los que más contribuyeron ( $r = 0.98$ ;  $-0,76$  y  $-0,57$  respectivamente). Además, únicamente los flavonoles están correlacionados directamente con la actividad antioxidante  $p < 0.05$  ( $r = 0.86$ ) estableciéndose así una relación con la bibliografía (Fernández-

Jalao et al.,2019). Por ello, los resultados obtenidos indicaron los tioles ejercen un efecto estabilizante, atribuyéndose el escaso pardeamiento enzimático que se produce con la pérdida de polifenoles no flavonoides como el ácido clorogénico, el ácido cafeico o el ácido ferúlico.

### 3.5 Limpieza y posible reutilización de los materiales mesoporosos funcionalizados

El material mesoporoso de sílice no funcionalizado (M-UVM-7) presentó una superficie específica ( $S_{BET}$ ) de 1059 m<sup>2</sup>/g, así como un sistema bimodal de poros, con poros de 2.83 nm (mesoporos) y 40.03 nm (macroporos o poros texturales) (tabla 4). Sin embargo, la superficie específica se ve reducida tanto para la funcionalización con tioles como para aminas. No obstante, esta superficie presenta una reducción más drástica para el material funcionalizado con aminas, ya que la carga de aminas por gramo de material es superior a la de tioles (Muñoz et al., 2020). Tras establecer un contacto con el zumo de manzana, la superficie específica de ambos materiales funcionalizados experimentaron una reducción del 88.1% para M-UVM-7-NH<sub>2</sub> y del 71% para M-UVM-7-SH, debido a la inmovilización de la enzima o de otros péptidos presentes en el zumo de manzana. Es posible que la alta capacidad de reacción de los grupos amino, así como el pH superior del medio hagan que este material interactúe mejor con los diferentes compuestos.

**TABLA 4.** Propiedades texturales de la matriz de sílice UVM-7, no funcionalizada y funcionalizada con tioles y aminas. Efecto tras el contacto con zumo de manzana y tras aplicar diferentes tratamientos de limpieza.

	M-UVM-7	-SH	Zumo -SH	T1 -SH	T2 -SH	-NH <sub>2</sub>	Zumo -NH <sub>2</sub>	T1 -NH <sub>2</sub>	T2 -NH <sub>2</sub>
$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	1059	1047	304	725	777	496	58,6	281	189
Tamaño mesoporo (nm)	2.83	2.73	2,55	2,61	2,61	2.49	2,7	2,53	2,5
Volumen mesoporo (cm <sup>3</sup> /g)	0.92	0.87	0,23	0,54	0,59	0.3	0,029	0,12	0,088
Tamaño macroporo (nm)	40.03	38.2	38,99	38,3	38,4	39.3	48,5	42	38,8
Volumen macroporo (cm <sup>3</sup> /g)	1.62	1.2	0,665	0,86	1	0.87	0,437	0,92	0,678

-SH hace referencia a M-UVM-7-SH y -NH<sub>2</sub> a M-UVM-7-NH<sub>2</sub>. T1 indica el tratamiento con agua acidificada a 50°C y T2 el tratamiento con ultrasonidos.

Con la finalidad de limpiar el material se aplicaron dos tratamientos diferentes; por un lado, agua acidificada a 50 °C y, por otro lado, se empleó agua acidificada a 50 °C en combinación con un tratamiento de ultrasonidos para tratar de desnaturalizar la PPO y proteínas adheridas a la superficie del material (Yu et al., 2018, Yan et al., 2019). El efecto para ambos fue un incremento en la superficie específica del material. En el caso del material M-UVM-7-SH fue

similar para los dos, el tratamiento con agua ácida conllevó una limpieza de la superficie del material del 58%, mientras que el tratamiento con ultrasonidos del 61%. Sin embargo, en la limpieza del material M-UVM-7-NH<sub>2</sub>, el tratamiento con agua ácida supuso un 10% más de limpieza que el tratamiento con ultrasonidos (79% frente al 69%).

A pesar de no conseguir una limpieza completa, las estrategias de limpieza fueron lo suficientemente efectivas para la reutilización de los materiales. El agua ácida y la técnica de ultrasonidos tuvieron el mismo efecto para M-UVM-7-SH y, para M-UVM-7-NH<sub>2</sub>, pero el tratamiento con agua ácida consiguió una mayor superficie específica y un mayor volumen de poros texturales. Podría decirse que el tratamiento con agua acidificada a 50 °C podría considerarse como el mejor mecanismo de limpieza al ser más sencillo y más económico.

#### 4. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el zumo tratado con M-UVM-7-SH presenta una mayor estabilidad en su acción inhibitoria de la enzima polifenoloxidasas. Además, junto con M-UVM-7, son los mejores tratamientos para mantener el pH inicial del zumo. Aunque con el tiempo se observe una reducción de los contenidos de compuestos bioactivos, el zumo tratado con M-UVM-7-SH es el que presenta menores pérdidas a los 30 minutos, en especial para la actividad antioxidante (19.5%), potencial fenólico (13.7%) y el contenido de vitamina C (22mg/100mL). A diferencia del zumo tratado con tios que a los 30 minutos no es significativamente distinto al color inicial del zumo sin tratar, los tratamientos con M-UVM-7 y UVM-7-NH<sub>2</sub>, son incapaces de detener el pardeamiento y sus efectos. Con todo ello, la magnetización ha sido una estrategia óptima para el tratamiento aplicado ya que evita técnicas como la filtración y, por tanto, la pérdida de compuestos bioactivos y sólidos solubles. Además, ha sido una característica esencial para la recuperación del material. Por último, los materiales mesoporosos de sílice pueden ser reutilizados de forma efectiva tras un tratamiento con agua ácida a 50°C, consiguiendo limpiar la superficie en un 58% para M-UVM-7-SH y un 79% para M-UVM-7-NH<sub>2</sub>.

#### REFERENCIAS

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., & Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182–1187.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512–523.
- Arora, B., Sethi, S., Joshi, A., Sagar, V. R., & Sharma, R. R. (2018). Antioxidant degradation kinetics in apples. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1306–1313.
- Botella, P., Corma, A., & Quesada, M. (2012). Synthesis of ordered mesoporous silica templated with biocompatible surfactants and applications in controlled release of drugs. *Journal of Materials Chemistry*, 22(13), 6394.
- Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N. S., & Versteeg, C. (2010). Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10076-10084.
- Dhyani, P., Bahukhandi, A., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Diversity of bioactive compounds and antioxidant activity in Delicious group of apple in Western Himalaya. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2587–2599.
- Eidhin, D. N., Degn, P., & O'Beirne, D. (2010). Characterization of polyphenol oxidase from rooster potato (*Solanum tuberosum* cv Rooster). *Journal of Food Biochemistry*, 34(1)13-30.

- Farouk, B., Aref, N., Rachid, C., Mourad, L., Emna, K., Fethi, B., Rania, B., Wafa, N., Kenza, B., Boumediene, M., Ali, G., Hubert, C., & Hicham, G. (2020). Characterization of three polyphenol oxidase isoforms in royal dates and inhibition of its enzymatic browning reaction by indole-3-acetic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 894–903.
- Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2019). Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 20–31.
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101–2110.
- Ghaferi, M.; Esfahani, M.K.; Aun Raza, Al Harthi, S.; Shahmabadi, H.E Alavi, S.E. (2021) Mesoporous silica nanoparticles: synthesis methods and their therapeutic use-recent advances. *Journal of Drug Targeting*, 29:2, 131-154.
- Hollman, P. C., & Arts, I. C. (2000). Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13.
- Illera, A. E., Chaple, S., Sanz, M. T., Ng, S., Lu, P., Jones, J., Carey, E., & Bourke, P. (2019). Effect of cold plasma on polyphenol oxidase inactivation in cloudy apple juice and on the quality parameters of the juice during storage. *Food chemistry: X*, 3, 100049.
- Ispas, C., Sokolov, I., & Andreescu, S. (2009). Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 543–554.
- İyidoğan, N. F. y Bayındırlı, A. 2004. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *Journal of Food Engineering* 62(3), 299-304.
- Jang, J.-H.; Moon, K.-D.; Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124 (2011), pp. 444-449
- Juárez-Enríquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N., Ramaswamy, H. S., & Ortega-Rivas, E. (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 2), 915–919.
- Jukanti A. (2017) Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry. In: Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Springer, Singapore.
- Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2013). Effect of l-ascorbic acid addition on quality, polyphenolic compounds and antioxidant capacity of cloudy apple juices. *European Food Research and Technology*, 236(5), 777–798.
- Kolniak-Ostek, J., Oszmiański, J., Rutkowski, K. P., & Wojdyło, A. (2014). Effect of 1-methylcyclopropene postharvest treatment apple and storage on the cloudy juices properties. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1166–1174.
- Liao, X. Y., Li, J., Muhammad, A. I., Suo, Y. J., Chen, S. G., Ye, X. Q., et al. (2018). Application of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma (Dbd-Acp) for *Eshcerichia Coli* inactivation in apple juice. *Journal of Food Science*, 83(2), 401–408.
- López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, Á., & García-Carmona, F. (2007). Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chemistry*, 101(3), 1164–1171.
- Manzocco, L.; Panozzo, A.; Nicoli, M.C. (2013). Inactivation of polyphenoloxidase by pulsed light. *Journal of Food Science*, 78 (8), pp. E1183-E1187
- Markowski, Jarosław & Plocharski, Witold & Mieszczakowska-Fraç, Monika. (2007). Effect of cultivar and processing on phenolics and antioxidant activity of apple products. *ActaHortic.*
- Marszałek, K., Woźniak, Ł., Barba, F. J., Skąpska, S., Lorenzo, J. M., Zambon, A., & Spilimbergo, S. (2018). Enzymatic, physicochemical, nutritional and phytochemical profile changes of apple (Golden Delicious L.) juice under supercritical carbon dioxide and long-term cold storage. *Food Chemistry*, 268, 279–286.
- Martinez, M.V.; Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*. 1-5
- Meneses, N.; Saldaña, G.; Jaeger H.; Raso, J.; Álvarez, I.; Cebrián, G.; Knorr, D (2013). Modelling of polyphenoloxidase inactivation by pulsed electric fields considering coupled effects of temperature and electric field. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, pp. 126-132

- Muñoz-Pina, S., Ros-Lis, J. V., Argüelles, Á., Coll, C., Martínez-Mañez, R., & Andrés, A. (2018). Full inhibition of enzymatic browning in the presence of thiol-functionalised silica nanomaterial. *Food Chemistry*, *241*, 199–205.
- Muñoz-Pina, S., Ros-Lis, J. V., Delgado-Pinar, E., Martínez-Camarena, A., Verdejo, B., García-España, E., Argüelles, Á., & Andrés, A. (2020). Inhibitory Effect of Azamacrocyclic Ligands on Polyphenol Oxidase in Model and Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(30), 7964–7973.
- Narayan R, Nayak UY, Raichur AM, Garg S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2018; *10*(3):118.
- Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., & Yeretjian, C. (2014). Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (pp. 253–264). Elsevier.
- Pavun, L., Đurđević, P., Jelikić-Stankov, M., Đikanović, D., & Uskoković-Marković, S. (2018). Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices. *Czech Journal of Food Sciences*, *36*(No. 3), 233–238.
- Pongener, A. (2018). *Chapter 9—Heat Treatment of Fruits and Vegetables*.
- Rangan, C., & Barceloux, D. G. (2009). Food Additives and Sensitivities. *Disease-a-Month*, *55*(5), 292–311
- Schmidt, J. M., Greve-Poulsen, M., Damgaard, H., Hammershøj, M., & Larsen, L. B. (2016). Effect of Membrane Material on the Separation of Proteins and Polyphenol Oxidase in Ultrafiltration of Potato Fruit Juice. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(5), 822–829.
- Selimović, A., Salkić, M., & Selimović, A. (2011). Direct Spectrophotometric Determination of L-Ascorbic acid in Pharmaceutical Preparations using Sodium Oxalate as a Stabilizer. *11*(02)
- Serra, S., Anthony, B., Boscolo Sesillo, F., Masia, A., & Musacchi, S. (2021). Determination of Post-Harvest Biochemical Composition, Enzymatic Activities, and Oxidative Browning in 14 Apple Cultivars. *Foods*, *10*(1), 186.
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*, *3*(4), 506–516.
- Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X., & Guo, Y. (2017). Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, *163*.
- Teribia, N., Buvé, C., Bonerz, D., Aschoff, J., Hendrickx, M., & Loey, A. V. (2021). Impact of processing and storage conditions on color stability of strawberry puree. *Journal of Food Engineering*, *294*.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 669–675.
- Vallet-Regí, M., Balas, F., & Arcos, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(40), 7548–7558.
- Vieira, F. G. K., Di Pietro, P. F., da Silva, E. L., Borges, G. S. C., Nunes, E. C., & Fett, R. (2012). Improvement of serum antioxidant status in humans after the acute intake of apple juices. *Nutrition Research*, *32*(3), 229–232.
- Waterhouse, A.L. (2002), Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *6*: 11.1.1-11.1.8.
- Whitaker, J.R.; Lee, C.Y. 1995. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning: an Overview. *Enzymatic Browning and Its Prevention*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2-7.
- Xiang, Q., Fan, L., Zhang, R., Ma, Y., Liu, S., & Bai, Y. (2020). Effect of UVC light-emitting diodes on apple juice: Inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* and determination of quality. *Food Control*, *111*, 107082.
- Yan, X., Meng, J., Hu, X., Feng, R., & Zhou, M. (2019a). Synthesis of thiol-functionalized mesoporous silica nanoparticles for adsorption of Hg<sup>2+</sup> from aqueous solution. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, *89*(3), 617–622.
- Yu, J., Wang, C., Wang, A., Li, N., Chen, X., Pei, X., Zhang, P., & Wu, S. G. (2018). Dual-cycle immobilization to reuse both enzyme and support by reblossoming enzyme–inorganic hybrid nanoflowers. *RSC Advances*, *8*(29), 16088–16094.
- Zhang, Xiang & Cresswell, Mark. (2016). *Silica-Based Amorphous Drug Delivery Systems*.