



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DESARROLLO DE NANOMATERIALES INHIBIDORES DE LA POLIFENOL OXIDASA (PPO)

Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

Autor

Nerea Ruano Clemente

Directores

Dr. Ana María Andrés Grau

Dr. Ángel Luis Argüelles Foix

Dr. José Vicente Ros Lis



DESARROLLO DE NANOMATERIALES INHIBIDORES DE LA POLIFENOL OXIDASA (PPO)

Nerea Ruano Clemente, Ana María Andrés Grau¹, Ángel Luis Argüelles Foix¹, José Vicente Ros Lis¹.

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD-UPV) Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera, s/n 46022 Valencia. España.

RESUMEN

La polifenol oxidasa (PPO) es una enzima que causa la reacción que se conoce como pardeamiento enzimático en muchas de las frutas y verduras que consumimos y que se traduce en un detrimento en su color, sabor, olor y valor nutricional. La actuación de la enzima se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en frutas y verduras para generar pigmentos parduzcos. Los nanomateriales mesoporosos, que han tenido una gran variedad de aplicaciones en los últimos años, podrían tener una funcionalidad potencial para la inmovilización de enzimas en procesos de la industria alimentaria, lo que permitiría desarrollar un método alternativo a los tratamientos térmicos tradicionales utilizados en la industria alimentaria. El objetivo de este trabajo es estudiar el potencial de retención de la PPO y de inhibición de su actividad utilizando diferentes materiales mesoporosos con diferentes estructuras, morfología y porosidades, y poder evaluar su capacidad de inmovilización e inhibición en disoluciones modelo preparadas con un enzima comercial. Los ensayos fueron realizados con los materiales Aerosil, MCM-41 Micro, MCM-41 Nano y UVM-7 y posteriormente con estos mismos materiales funcionalizados con grupos tioles. Todos los ensayos fueron realizados a un pH de 3,5 ya que este valor es el más común entre frutas y verduras. El nanomaterial que mejor respuesta obtuvo en cuanto a la inhibición de la PPO fue el UVM-7 funcionalizado con tioles.

PALABRAS CLAVE: PPO, polifenol oxidasa, pardeamiento enzimático, nanomaterial mesoporoso, tiol.



ABSTRACT

Polyphenol oxidase (PPO) is an enzyme that causes the reaction is known as enzymatic browning in many of the fruits and vegetables we eat and which results in a detriment in color, taste, smell and nutritional value. The action of the enzyme is based on the oxidation of phenolic compounds present in fruits and vegetables to generate brownish pigments. Mesoporous nanomaterials which have had many applications in recent years, may have potential functionality for the immobilization of enzymes in processes of the food industry, allowing to develop an alternative method to traditional thermal treatments used in industry food. The objective of this work is to study the potential retention and inhibition of PPO activity using different mesoporous materials with different structures, morphology and porosity, and to evaluate their immobilization capacity and inhibition in model solutions prepared with a commercial enzyme. The assays were conducted with the Aerosil, MCM-41 Micro, MCM-41 Nano and UVM-7 materials and subsequently with these same materials functionalized with thiol groups. All assays were performed at pH 3.5, that value is the most common fruits and vegetables. The nanomaterial best response obtained for inhibition of PPO was thiol containing UVM-7.

KEY WORDS: PPO, polyphenol oxidase, enzymatic browning, mesoporous material, thiol.



RESUM

La polifenol oxidasa (PPO) es un enzim que causa la reacció que se coneix com enfosquiment enzimàtic en moltes de les fruites i verdures que consumim i que se tradueix en un detriment en el seu color, sabor, olor i valor nutritiu. L'actuació de l'enzim se basa en l'oxidació dels composts fenòlics presents en fruites i verdures per a generar pigments marronosos. Els nanomaterials mesoporosos, que han tingut una gran varietat d'aplicacions en els últims anys, podrien tindre una funcionalitat potencial per a l'immobilizació d'enzims en processos de l'indústria alimentària, lo que permetria desenvolupar un mètode alternatiu als tractaments tèrmics tradicionals utilitzats. L'objectiu d'este treball es estudiar el potencial de retenció de la PPO i d'inhibició de la seua activitat utilitzant diferents materials mesoporosos en diferents estructures, morfologia i porositats, i poder evaluar la seua capacitat d'immobilizació i inhibició en dissolucions model preparades en un enzim comercial. Els ensaïos foren realitzats en els materials Aerosil, MCM-41 Micro, MCM-41 Nano i UVM-7 i posteriorment en estos mateixos materials funcionalitzats en grups tiols. Tots els ensaïos foren realitzats a un pH de 3,5 ja que este valor es el més comú entre fruites i verdures. El material que millor resposta obtingué en quant a l'inhibició de la PPO fou l'UVM-7 funcionalitzada amb tiols.

PARAULES CLAU: PPO, polifenol oxidases, enfosquiment enzimàtic, material mesoporós, tiol.

1. INTRODUCCIÓN

La comisión internacional de enzimas (EC) clasifica la polifenol oxidasa (Número EC 1.10.3.1) dentro del grupo de las oxidoreductasas ya que esta actúa sobre los difenoles como aceptor de oxígenos.

La polifenol oxidasa (PPO), más conocida como tirosinasa, fenolasa, catecol oxidasa, *o*-difenoloxidasa, monofenol oxidasa y creolasa, debido a su actividad como oxidante de los polifenoles, fue descubierta y aislada por primera vez en hongos, siendo esta una de las razones por las que la polifenol oxidasa de los hongos se usa como modelo en la mayoría de los estudios realizados. Esta enzima puede actuar con dos tipos de sustratos: monohidroxifenoles (ej: *p*-cresol) y *o*-dihidroxifenoles (ej: catecol). El primer tipo de sustrato es hidrolizado en *o*-fenoles y el segundo tipo es oxidado formando quinonas. Estas quinonas se polimerizan después en otras quinonas fenólicas, creando pigmentos pardos marrones. Ver Figura 1.

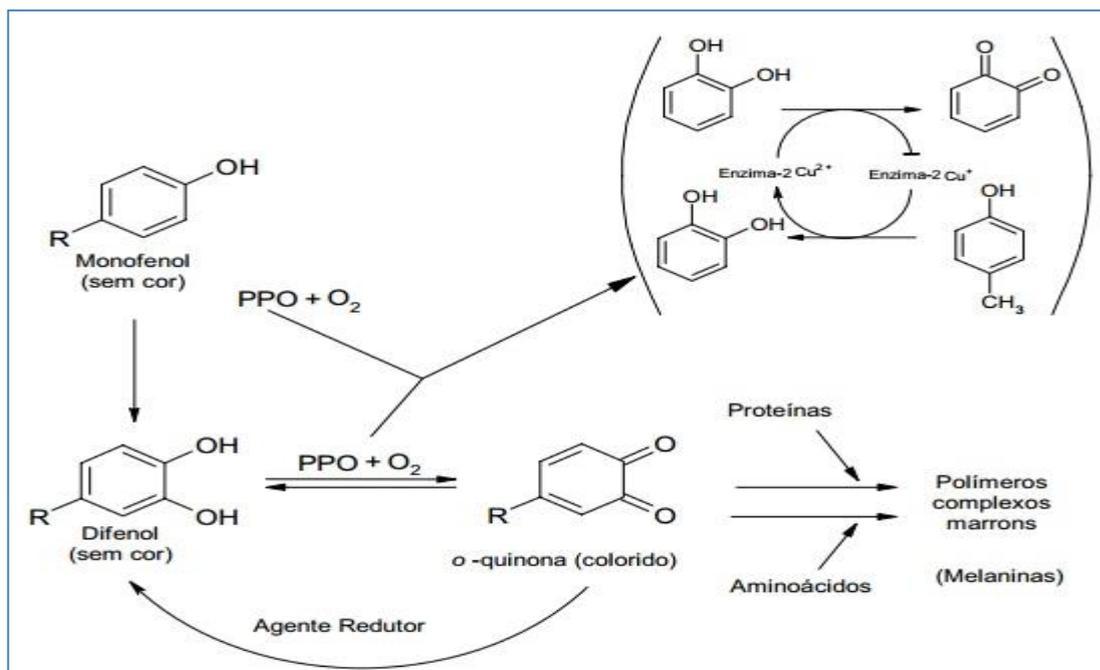


FIGURA 1. Mecanismo de reacción de la polifenol oxidasa en plantas (Otwell, 1992).

El control del pardeamiento enzimático es una de las tareas más importantes dentro del sector de la industria hortofrutícola, porque esta reacción ocurre en la mayoría de frutas y verduras que consumimos, afectando de esta manera a los atributos de color, sabor, flavor, y valor nutricional. Se estima que más del 50% de las frutas del mercado se pierden como resultado del pardeamiento enzimático (Whitaker and Lee, 1995).

Una de las frutas que más se ve afectada por el pardeamiento enzimático es la manzana (*Malus domestica*) debido a su gran contenido en polifenoles,



es uno de los productos que más aporta estos compuestos a la dieta humana (Hertog *et al.*, 1992). El pardeamiento enzimático es un gran problema en la industria de transformación de frutas y verduras, pero sobre todo en la industria de los zumos (Coseteng and Lee, 1987). Muchos estudios han demostrado que el pardeamiento enzimático está relacionado con el contenido de polifenoles (Murata *et al.*, 1995) y/o con la actividad polifenol oxidasa (Walker, 1964).

Diferentes métodos se han utilizado a lo largo de los años para evitar el pardeamiento enzimático en frutas y vegetales en la industria. Los sulfitos se han utilizado como agentes preventivos del pardeamiento, pero estos pueden producir alergias en la población y se ha restringido su uso en alimentos y bebidas (Sapers, 1993). Los tratamientos térmicos son inadecuados para inhibir la reacción enzimática, ya que estos reducen el contenido de nutrientes y vitaminas y a veces puede inducir a un mayor pardeamiento enzimático (Toribio y Lozano, 1986). Por otro lado la adición de ácido ascórbico es una buena alternativa al uso de sulfitos y otros agentes químicos (Denoya *et al.*, 2012). Otras técnicas más novedosas como los ultrasonidos (Abid *et al.*, 2013), el uso de CO₂ supercrítico (Gui *et al.*, 2005), los pulsos eléctricos (Ho *et al.*, 1996), las altas presiones hidrostáticas (Juarez-Enriquez *et al.*, 2014) y la luz ultravioleta (Müller *et al.*, 2014) han mostrado buenos resultados en la inhibición del pardeamiento enzimático, pero estas técnicas aún están en desarrollo y su implantación industrial es muy cara.

Por otro lado, desde principios de los años 90, el desarrollo de nuevos materiales nanoporosos ha sido muy importante en las investigaciones científicas sobre materiales. Por consiguiente se han buscado aplicaciones para estos materiales en distintos campos como la catálisis (Taguchi y Schüth, 2005), el desarrollo de medicamentos (Vallet-Regí *et al.*, 2001) y la industria de la alimentación (Pérez-Esteve *et al.*, 2013).

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los materiales nanoporosos pueden clasificarse, en función del tamaño de poro, en: materiales microporosos como aquellos que tienen poros con un diámetro de menos de 2 nm, materiales macroporosos aquellos que tienen diámetros de poro mayor de 50 nm y materiales mesoporosos como aquellos que tienen un tamaño de poro entre 2-50 nm. La distribución de los poros de estos materiales, su gran superficie y sus tamaños de poros hacen que sean comparables con el tamaño de las enzimas (Wang y Caruso, 2005).

Las propiedades físico-químicas de los materiales mesoporosos los hacen unos candidatos ideales para la inmovilización o la inhibición de la polifenol oxidasa. Hay muchos estudios sobre la inmovilización de enzimas (Arroyo, 1998; Datta *et al.*, 2013), pero solo unos pocos tratan sobre la polifenol oxidasa y los materiales mesoporosos (Mangrulkar *et al.*, 2012).

En términos generales, la preparación de materiales mesoporosos a base de silicatos con surfactantes se puede ver en la Figura 2, requiere una fuente de silicatos, una catálisis para la polimerización de los silicatos, un surfactante y un solvente, que normalmente es agua.

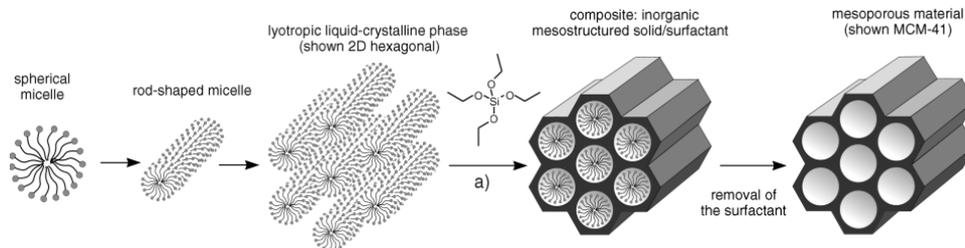


FIGURA 2. Proceso de síntesis de materiales mesoporosos por LCT (Gibson, 2013).

Los surfactantes de pequeño tamaño molecular, como el bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), producen materiales con una tamaño de poro entre 2 y 3 nm, por otro lado los surfactantes poliméricos, como los copolímeros tribloques, pueden producir tamaños de poro más grande, hasta un diámetro de 30 nm.

El nombre de los materiales en este campo está bajo la revisión de la Comisión de Materiales Mesoporosos de la “International Zeolite Association” (IZA). La mayoría de las veces los descubridores de los materiales mesoporosos han sido quienes les han puesto nombre, usando tres letras seguidas de un número. Las letras hacen referencia a la universidad, compañía o grupo de investigación que ha descubierto el material y cada uno tiene un sistema de números interno.

Desde el descubrimiento de los primeros materiales mesoporosos a principio de los 90 ha habido un gran progreso a la hora de realizar las síntesis del material, el tamaño de poro, estructura. Al mismo tiempo estos materiales tienen un gran potencial en cuanto a sus aplicaciones.

Los objetivos de este trabajo son probar una serie de materiales mesoporosos y sus funcionalizaciones para comprobar si son capaces de inhibir o inactivar la polifenol oxidasa, realizando ensayos de inmovilización de proteínas y ensayos de actividad polifenol oxidasa, estableciendo unos parámetros de concentración y de pH específicos.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Bifosfato de sodio (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), dopamina hidroclicada ($(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$), polifenol oxidasa (tirosinasa) de hongos liofilizada (≥ 1000 unidades/mg), reactivo de Bradford y proteína standard (seroalbumina bovina 1 mg/ml) para el método Bradford fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Los materiales Aerosil, MCM-41 Micro, MCM-41 Nano y UVM-7 así como sus homólogos funcionalizados con tioles fueron proporcionados por el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia.

2.2 Ensayos de inmovilización de proteínas

La concentración de proteína fue medida por el método Bradford (Bradford, 1976) que es un método espectrofotométrico que se basa en la unión de la proteína a un colorante, formando un complejo azul. Previamente a proceder con las medidas se realizó una recta de calibrado con seroalbumina bovina, para así obtener la ecuación de la recta y poder calcular la concentración de proteína de las disoluciones con el material. Las medidas fueron hechas por duplicado para los ocho materiales probados. Las medidas de absorbancia fueron hechas en el espectrofotómetro JASCO Modelo V-630 a una longitud de onda de 595 nm y en cubetas de plástico de 2 ml.

Para los ensayos de inmovilización de proteínas se partió de una disolución de tampón fosfato 50 mM a pH 3,5 con una concentración de enzima de 0,25 mg/ml (1500 u/mg). Previamente a probar los materiales se midió la cantidad de proteína en la disolución madre con el método que se iba a utilizar para ver la capacidad de inmovilización de los materiales. Para los ensayos de inmovilización de proteínas, aproximadamente 1 mg de material fue puesto en contacto con 1 mL de disolución en un eppendorf. Las medidas se realizaron a tiempos de 10 y 120 minutos.

2.3 Ensayos de actividad Polifenol oxidasa (PPO)

La actividad inicial de la polifenol oxidasa comercial fue medida con un método espectrofotométrico. La mezcla para que se produzca la reacción de oxidación consiste en 1 ml de tampón fosfato 10 mM a pH 4; 0,25 ml de la disolución de enzima y 0,25 ml de dopamina 0,12 mM como sustrato. La absorbancia de la muestra fue medida a diferentes tiempos: 0, 10, 20, 30,



40, 50 y 60 en una longitud de onda de 420 nm con el espectrofotómetro JASCO Modelo V-630.

Se siguió el mismo procedimiento con las disoluciones de la enzima con el material, midiendo a los mismos tiempos, para así obtener la curva de la actividad de la polifenol oxidasa sola y de esta con los materiales y así poder observar las diferencias en el comportamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los nanomateriales

La síntesis del soporte mesoporoso del tipo MCM-41Micro se lleva a cabo siguiendo la denominada “ruta de los atranos”, una técnica preparativa sencilla basada en el uso de los complejos que incluye ligandos relacionados con la trietanolamina (TEAH_3) como precursor inorgánico y surfactante como agente director de la estructura. El material mesoporoso MCM-41nano se sintetiza siguiendo el procedimiento del bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y por último el material UVM-7 se sintetiza mediante la ruta de los “atranos” basada en el empleo de complejos como trietanolamina (TEAH).

Como se ve en la Tabla 1 la diferencia entre los cuatro nanomateriales está en su morfología; el nanomaterial Aerosil está formado por esferas de SiO_2 , los materiales MCM-41 Micro y MCM-41 Nano también son esferas de SiO_2 pero con poros, el tamaño de los poros es lo que diferencia entre el material Micro y el Nano y por último el UVM-7 es un material amorfo en el que se aglutinan varias esferas de SiO_2 con microporos dejando en su interior macroporos. En la Figura 3 podemos ver fotos al microscopio de estos tres últimos materiales.

TABLA 1. Características de los cuatro nanomateriales utilizados

Nanomaterial	Estructura	Tamaño de poro	Superficie
Aerosil	Esferas de SiO_2	-	200 m^2/g
MCM-41 Micro	Partículas de SiO_2 con poros	>50 nm	>1000 m^2/g
MCM-41 Nano	Partículas de SiO_2 con poros	2-50 nm	>1000 m^2/g
UVM-7	Aglutinación de partículas de SiO_2 con poros que deja macroporos en su interior	- Micropartículas de SiO_2 poros de 2-50 nm - Macroporos >100 nm	>1000 m^2/g

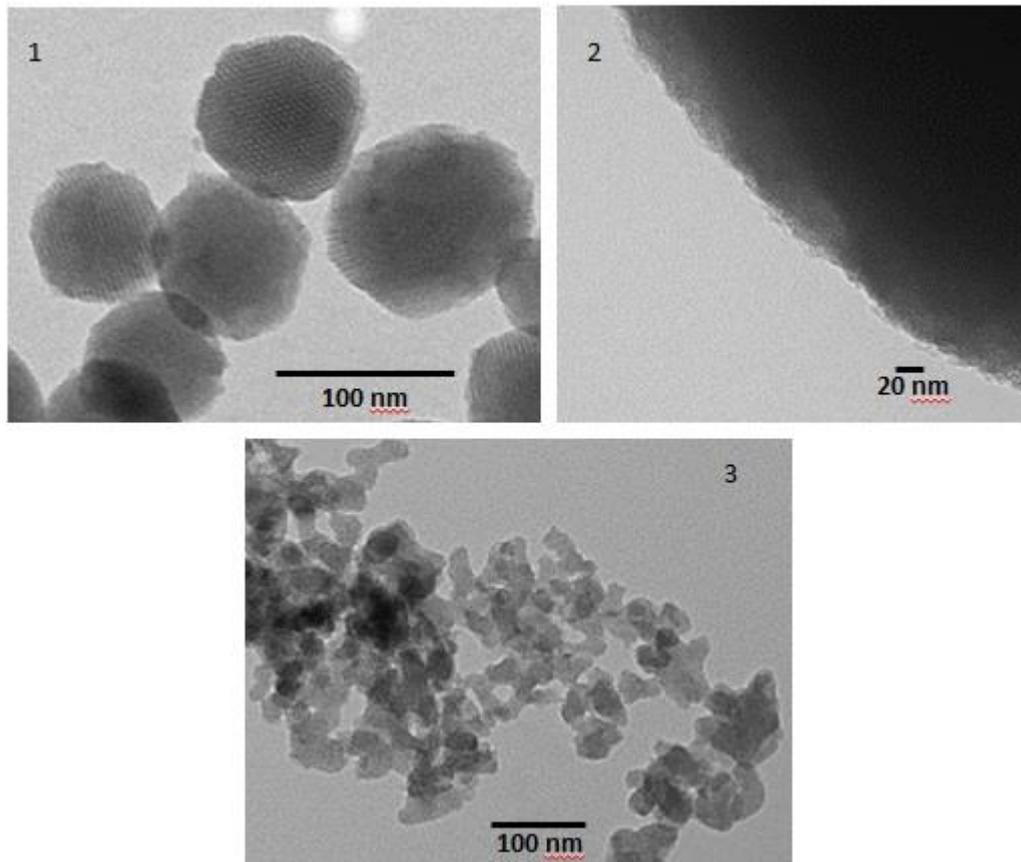


FIGURA 3. Vista al microscopio TEM de los materiales mesoporosos. 1 MCM-41 Nano. 2 MCM-41 Micro. 3. UVM-7.

Para la funcionalización con grupos tioles de la superficie de estos materiales 1 g de cada uno de los materiales han sido suspendidos en 30 mL de acetonitrilo y sobre dicha mezcla se han añadido 1.86 mL (10 mmol) de 3-mercaptopropiltrióxido de silano (MPTS). La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. El material funcionalizado se aisló por centrifugación, se lavó con acetonitrilo y se secó a 37°C.

En la Tabla 2 podemos ver las cantidades de tioles que quedaron en la superficie de los materiales.

TABLA 2. Cantidad de tioles en la superficie de los materiales tras su funcionalización medido por la técnica de TGA.

Material	mmoles/SiO ₂
Aerosil	0,31
MCM-41 Micro	0,55
MCM-41 Nano	0,78
UVM-7	0,54



3.2 Ensayos de inmovilización de proteínas

Se partía de una cantidad inicial de enzima de 0,25 mg y cómo podemos observar en las Figuras 4 y 5, la polifenol oxidasa (tirosinasa) se mantiene bastante estable durante el ensayo, por lo que podemos deducir que los valores obtenidos con los materiales no son producto de una degradación natural del enzima y que estos realmente atrapan o inhiben la polifenol oxidasa. La concentración de material usada en los ensayos es de 1 mg/ml.

En la Figura 4 se muestra la evolución de la cantidad de proteína libre en la disolución de los materiales sin funcionalizar y en la Tabla 3 se muestran los porcentajes de proteína retenida. Se puede observar como a los 10 minutos ya se ve que los materiales hacen efecto capturando entre un 15-25% de la enzima, siendo el material Aerosil el que mejor resultado da con un captura del 26,15% y el que peor respuesta da el UVM-7 con una disminución de enzima presente en disolución del 15,09%. Al cabo de 2 horas de contacto del material con la enzima el porcentaje de captura se sitúa entre un 50-63%, siendo como en la medida anterior el material Aerosil el que mejor respuesta da con un 62,93% y el que peor el UVM-7 con un 50,4%.

TABLA 3. Porcentaje de retención de enzima de los materiales sin funcionalizar y funcionalizados.

	Porcentaje de retención de enzima			
	10 minutos		120 minutos	
	Sin funcionalizar	Funcionalizados	Sin funcionalizar	Funcionalizados
Aerosil	26,15 ±0,01	30,96 ±0,01	62,94 ±0,01	62,23 ±0,01
MCM-41 Micro	23,10 ±0,01	14,17 ±0,02	59,48 ±0,01	70,68 ±0,02
MCM-41 Nano	16,37 ±0,01	18,35 ±0,01	52,99 ±0,01	64,64 ±0,02
UVM-7	15,10 ±0,02	15,99 ±0,02	50,41 ±0,01	66,54 ±0,02

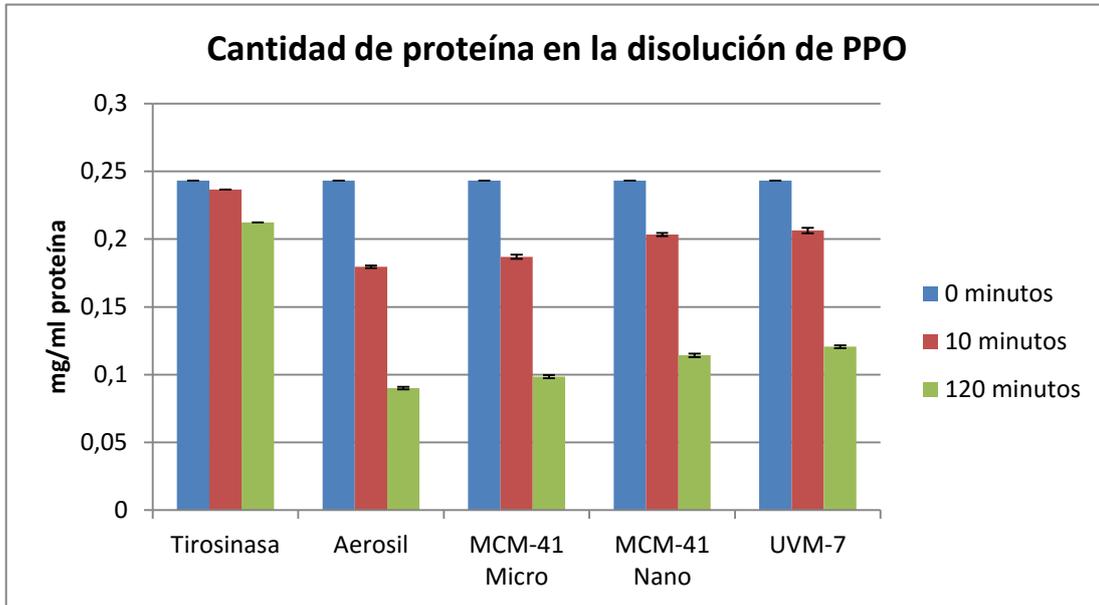


FIGURA 4. Cantidad de proteína libre en la disolución tras la inmovilización con los nanomateriales sin funcionalizar con una concentración de enzima de 0,25 mg/ml y una cantidad de material de 1 mg/ml.

Como en los materiales sin funcionalizar se puede ver en la Figura 5, que a los 10 minutos ya se observan los efectos del material sobre la enzima, el porcentaje de captura esta entre el 15-30% (Tabla 3), siendo el que mejor actividad ofrece el material Aerosil-SH con un 30,96% y el que peor respuesta da el Micro-SH con un 14,16% de captura. Se puede observar una ligera mejoría en la respuesta de con los materiales funcionalizados, excepto con el material Micro-SH, que su nivel de captura es peor que en ausencia de tioles. Al cabo de 2 horas de contacto de la enzima con los materiales el porcentaje de captura se sitúa entre un 62-70%, en este caso el que mejor respuesta da al cabo de 2 horas es el material Micro-SH con un disminución de la enzima presente en disolución del 70,67% y el que peor respuesta da el material Aerosil-SH con un valor del 62,23%.

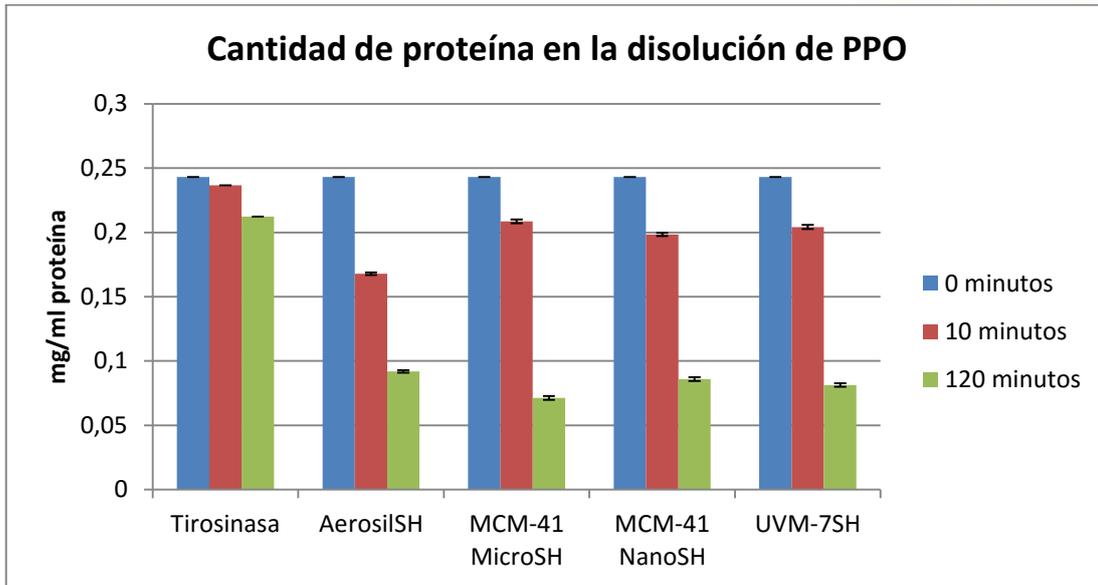


FIGURA 5. Cantidad de proteína libre en la disolución tras la inmovilización con los nanomateriales funcionalizados con una concentración de enzima de 0,25 mg/ml y una cantidad de material de 1 mg/ml.

Sin embargo, aunque los valores de captura son ligeramente mejores con los materiales funcionalizados no se observan grandes diferencias entre los valores de los materiales sin funcionalizar como se puede observar en la Tabla 3. Los materiales que mejor respuesta dan son los que están hechos de micropartículas ya que el tamaño del material es del mismo tamaño que la enzima y los materiales con nanopartículas obtienen peores resultados, esto puede ser debido a que como el tamaño de partícula del material es menor que el de la enzima le cueste más atrapar a esta o se necesite una concentración mayor para obtener los mismo resultados que con otros materiales. Los grupos tioles de los materiales funcionalizados actúan uniéndose al centro activo de la enzima, de esta manera no se puede producir la reacción de oxidación de los polifenoles, estos no pueden adherirse al centro activo porque ya está ocupado por el grupo tiol. De esta manera podría explicarse porque en el caso del material MCM-41Micro a los 10 minutos de contacto con la enzima, el material sin funcionalizar muestra una mayor retención de enzima que el material funcionalizado. Esto puede ser porque los grupos tioles se hayan adherido al centro activo de la enzima, pero que el material no haya rodeado del todo la enzima.



3.3 Ensayos de actividad de la polifenol oxidasa (PPO)

Los ensayos de actividad de la polifenol oxidasa (PPO) se realizaron tras dejar un tiempo de contacto enzima-material de 2 horas, ya que en los ensayos de inmovilización se pudo observar que tras tiempos largos de contacto la interacción enzima-material es mejor.

Primero se hizo un ensayo de actividad solo con la polifenol oxidasa (tirosinasa) para observar la curva de cinética sin materiales, después se probó cada material con la enzima y se repitió esta curva.

La Figura 6 muestra las curvas de cinética obtenidas con los materiales sin funcionalizar, en ella se puede observar que se produce una disminución de la actividad de la polifenol oxidasa con todos los materiales. Esta disminución de la actividad se puede ver en la Tabla 4 se encuentra entre un 19-45% con respecto a la actividad sin material. El material que más disminuyó la actividad fue el UVM-7 con un 45,33%, estos datos son muy parecidos a los obtenidos en los ensayos de inmovilización, ya que el porcentaje de retención de este material es del 50,4%, sin embargo el que menos disminuyó la actividad es el material MCM-41 Micro con una disminución del 19,13%, mientras que en el ensayo de retención tenía un porcentaje del 59%. Lo mismo sucede con los otros dos materiales, la disminución de la actividad de la polifenol oxidasa es menor de la esperada.

TABLA 4. Porcentaje de disminución de la actividad de la polifenol oxidasa con los materiales sin funcionalizar durante una hora.

Porcentaje de disminución de actividad de la polifenol oxidasa		
Aerosil	38,52	42,54
MCM-41 Micro	19,14	29,27
MCM-41 Nano	27,52	38,70
UVM-7	45,33	57,56

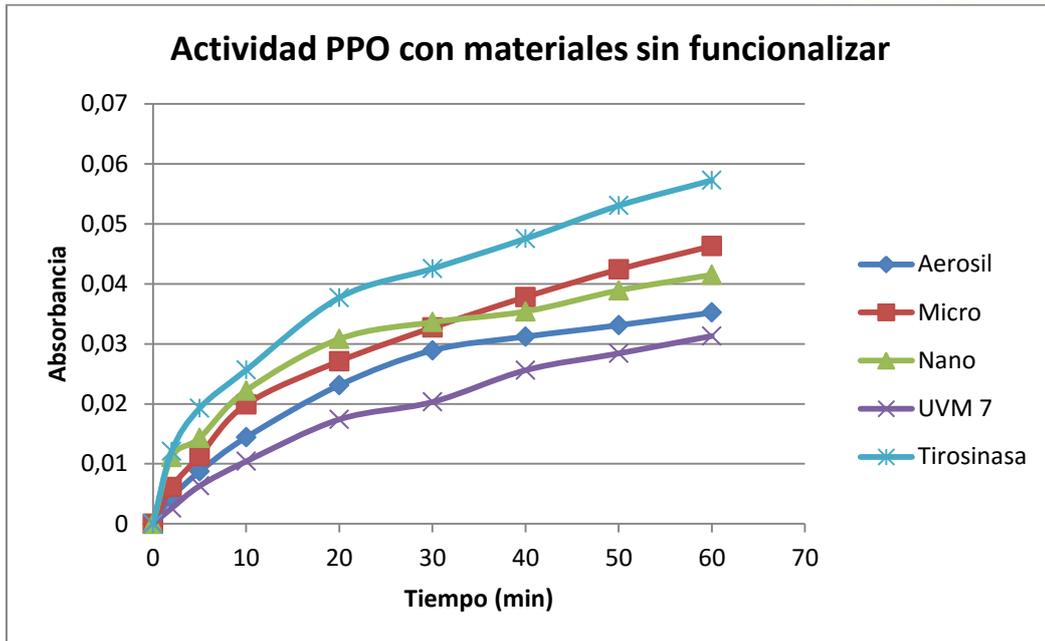


FIGURA 6. Curva de actividad de la polifenol oxidasa con los materiales sin funcionalizar con una concentración de enzima de 0,25 mg/ml y una cantidad de material de 1 mg/ml.

En cuanto a los materiales funcionalizados con tioles en la Figura 7 se pueden observar los resultados obtenidos. Se puede ver que también hay una disminución de la actividad con todos los materiales, en este caso la disminución de la actividad se encuentra entre 29-57%, una ligera mejoría en comparación con los materiales sin funcionalizar. El material que más disminuye la actividad como en el caso anterior es el UVM7-SH con un 57,56% de disminución de la actividad que también se acerca a su porcentaje de retención que está en un 66,54%, en este caso también es el material MCM-41 Micro-SH el que menos disminución de la actividad tiene, con un porcentaje del 29,27%, alejándose de su porcentaje de retención del 70%. También sucede lo mismo con los dos materiales restantes, su capacidad para disminuir la actividad es menor de la esperada.

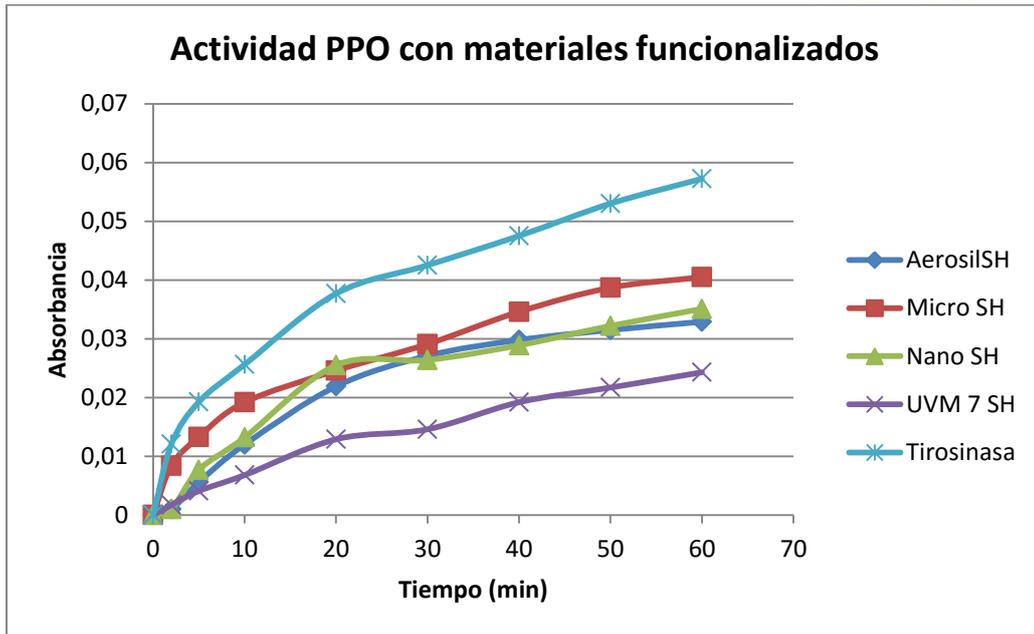


FIGURA 7. Curva de actividad polifenol oxidasa con los materiales funcionalizados con tioles con una concentración de enzima de 0,25 mg/ml y una cantidad de material de 1 mg/ml.

Como podemos observar en la Figura 8, donde podemos encontrar un gráfico de barras en el que se muestra la actividad PPO tras 1 hora de medición de los materiales sin funcionalizar y funcionalizados con tioles se puede decir que hay diferencias entre ellos.

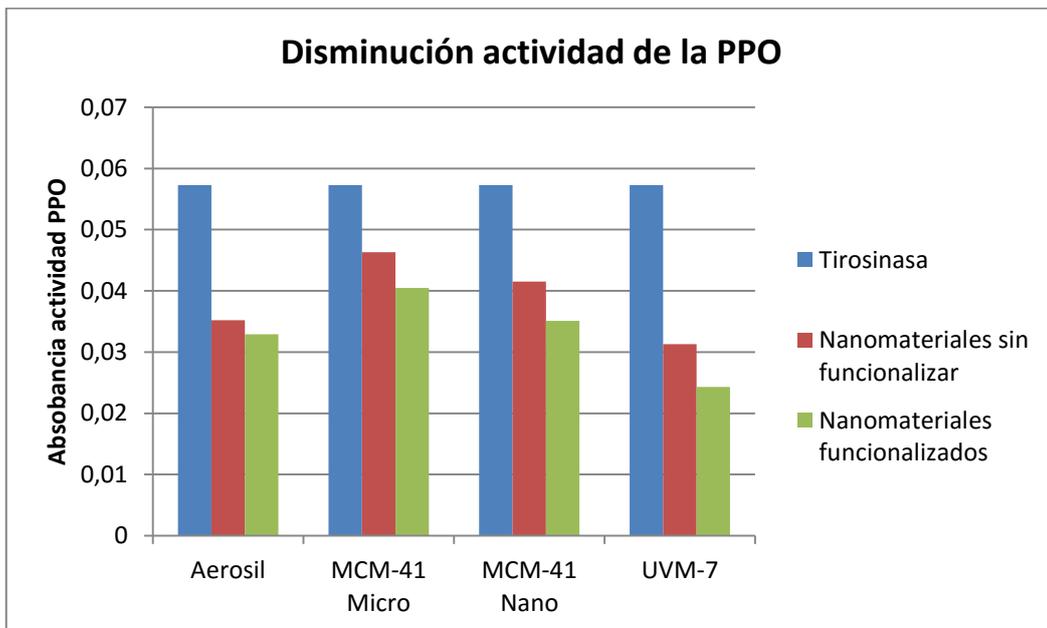


FIGURA 8. Comparación de actividad de la polifenol oxidasa con los materiales sin funcionalizar y los funcionalizados con tioles.



4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado la capacidad de inactivar o inhibir la PPO con los nanomateriales mesoporosos Aerosil, MCM-41 Micro, MCM-41 Nano y UVM-7 y sus respectivas funcionalizados con tioles. Cada uno de estos materiales tiene una estructura y morfología distintas que afectan a la hora de retener la enzima, se ha visto que los materiales con microporos retienen mejor la enzima que los que tienen nanoporos. En cuanto a la funcionalización de estos materiales con grupos tioles se puede apreciar que dan resultados ligeramente mejores que con los materiales sin funcionalizar. Por otro lado en cuanto a los ensayos de actividad de la polifenol oxidasa se puede decir también que los materiales han disminuido la actividad de la enzima y como sucedía con los ensayos de retención, los materiales funcionalizados han dado una respuesta mejor que los materiales sin funcionalizar. Por todo ello podemos decir que los nanomateriales pueden tener un futuro en la industria de la alimentación como uso en la inactivación o inhibición de la polifenoloxidasa para sustituir a los métodos tradicionales de inactivación de esta que causan mermas en la calidad del producto, alterando su sabor, olor y valor nutricional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abid, M.; Jabbar, S.; Hu, B.; Hashim, M. M.; Wu, T.; Lei, S.; Khan, M. A., Zeng, X. 2013. Thermosonication as a potencial quality enhancement technique. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21:984-990.
- Abid, M.; Jabbar, S.; Wu, T.; Hashim, M, M.; Hu, B.; Lei, Shicheng.; Zhang, X.; Zeng, X. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemestr.* 20:1182-1187.
- Arroyo, M. 1998. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. *Ars Pharmaceutica.* 39:23-29
- Atluri, R. 2010. Novel Syntheses, Structures and Functions of Mesoporous Silica Materials. Doctoral Thesis in Engineering Sciences, Nanotechnology and Functional Materials at Uppsala University, Sweden. ISBN 978-91-554-7786-8.
- Baslar, M.; Ertugay, M, F. 2012. The effect of ultrasound and photosonication treatment on polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and color of apple juice. *International Journal of Food Science and Technolog.* 48:886-892.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principe of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistr.* 72(1):248-254.



- Buckow, R.; Weiss, U.; Knorr, D. 2009. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10:441-448.
- Coseteng, M. Y., Lee, C. Y. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*. 52:985-989.
- Da Rocha, D.; Pimenta, Z.; Oliveira, C.; Araújo, F.; Barbosa, N.; Moreira, P. 2014. Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT - Food Science and Technology*. 1-7.
- Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 3:1-9.
- Denoya, G. I., Ardanaz, M., Sancho, A. M., Benítez, C. E., González, C., Guidi, S. 2012. Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas Cv. Granny Smith mínimamente procesadas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 38:263-267.
- Edler, K. J. 2011. Mesoporous silicates. In: Bruce, D. W., O'Hare, D, Walton, R. I. (eds). *Porous Materials*. John Wiley & Sons, Ltd, Publication, United Kingdom, 69-145.
- Gibson L. T. 2014. Mososilica materials and organic pollutant adsorption: part A removal from air. *Chemical Society Reviews*. 43:5163-5174.
- Gui, F.; Wu, J.; Chen, F.; Liao, X.; Hu, X.; Zhang, Z.; Wang, Z. 2005. Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbón dioxide. *Eur Food Res Technol*. 223:427-432.
- Gui, F.; Wu, J.; Chen, F.; Liao, X.; Hu, X.; Zhang, Z.; Wang, Z. 2005. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbón dioxide. *Food Chemistry*. 100:1678-1685.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:2379-2383.
- Ho, S. Y.; Mittal, G. S.; Cross, J. D. 1996. Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Engineering*. 31:69-84.
- Inagaki, S., Fukushima, Y., Kuroda, K. 1993. Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate. *Journal o the chemical Society, Chemical Communication*. 8:680-682.
- Juarez-Enriquez, E.; Salmeron-Ochoa, I.; Gutierrez-Mendez, N.; Ramaswamy, H. S.; Ortega-Rivas, E. 2014. Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*. 1-5.
- Kiewning, D.; Wollseifen, R.; Schmitz-Eiberger, M. 2013. The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit. *Food Chemistry*. 140:99-104.
- Lee, M. R. F.; Tweed, J. K. S.; Sullivan, M. L. 2012. Oxidation of *ortho*-diphenols in red clover with and without polyphenol oxidase (PPO) activity and their role in PPO ativation and inactivation. *Grass and Forage Science*. 68:83-92.
- Mangrulkar, P. A., Yadav, R., Meshram, J. S., Labhsetwar, N. K., Rayalu, S. S. 2012. Tyrosinase-Immobilized MCM-41 for the detection of phenol. *Water, Air & Soil Pollution*. 223:819-825.



- Marsellés-Fontanet, Á. R.; Martín-Belloso, O. 2007. Optimization and validation of PEF processing conditions to inactivate oxidative enzymes of grape juice. *Journal of food Engineering*. 83:452-462.
- Müller, A.; Noack, L.; Greiner, R.; Stahl, M. R.; Posten, C. 2014. Efect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 26:498-504.
- Murata, M., Noda, I., Homma, S. 1995. Enzymatic browning of apples on the market: Relationship between browning, polyphenol content, and polyphenol oxidase. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-Shi*. 42:820-826.
- Pérez-Esteve, E., Bernardos, A., Martínez-Máñez, R., Barat, J. M. 2013. Nanotechnology in the development of novel functional foods or their package. An Overview Based in Patent Analysis. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 5:35-43.
- Queiroz, C.; Ribeiro da Silva, A. J.; Mendes, M. L.; Fialho, E.; Valente-Mesquita, V. L. 2010. Poluphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chemistry*. 125:128-132.
- Riener, J.; Noce, F.; Cronin, D. A.; Morgan, D. J.; Lyng, J. G. 2007. Combined effect of temperatura and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food chemistry*. 109:402-407.
- Sapers, G. M. 1993. Browning of Foods: Control by Sulfites, Antioxidants, and Others Means. *Food Technology*. 47:75-84.
- Taguchi, A., Schüth, F. 2005. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Microporous and Mesoporous Materials*. 77:1-45.
- Toribio, J. L., Lozano, J. E. 1986. Heat induced browning of clarifield apple juice at high temperaturas. *Journal of Food Science*. 51:172-175.
- Van Loey, A.; Verachtert, B.; Hendrickx, M. 2002. Effects of high electric field pulses on enzymes. *Trends in Food Science and Technology*. 12:94-102.
- Walker, J. R. L. 1964. Studies on the enzymatic browning of apples II. Properties of apple polyphenoloxidase. *Australian Journal of Biological Sciences*. 17:360-371.
- Wang, Y., Caruso, F. 2005. Mesoporous Silica Spheres as Supports of Enzyme Immobilization and Encapsulation. *Chemistry of Materials*. 17:953-961.
- 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.
- Wojdylo, A.; Oszmianski, J.; Bielicki, P. 2013. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:2762-2772.