

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**EFEECTO DEL ENVASADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS EN LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE DOS CULTIVARES DE NOPAL VERDURA  
(*Opuntia ficus-indica* Mill.)**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

M. en C. Rosa Isela Ventura Aguilar

**DIRECTORA DE LA TESIS**

Dra. Elsa Bosquez Molina

**ASESORES**

Dr. Fernando Rivera Cabrera

Dr. Daniel Méndez Iturbide

México, D.F. a 18 de Diciembre del 2013

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

México, D.F. a 18 de Diciembre del 2013

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO DEL ENVASADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS EN LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE DOS CULTIVARES DE NOPAL VERDURA  
(*Opuntia ficus-indica* Mill.)**

Que presentó  
**M. en C. Rosa Isela Ventura Aguilar**

**Comité Tutorial:**

**Directora:** Dra. Elsa Bosquez Molina  
**Asesor:** Dr. Fernando Rivera Cabrera  
**Asesor:** Dr. Daniel Méndez Iturbide

**Jurado:**

**Presidente:**



Dr. José Ramón Verde Calvo

**Secretario:**



Dr. Fernando Rivera Cabrera

**Vocal:**



Dra. Silvia Bautista Baños

**Vocal:**



Dr. Daniel Méndez Iturbide

## DEDICATORIA

### **A mi familia:**

Hermanos: Elianet, Anai, Naut.

Sobrinos: Abigail, Miguel, Osvaldo y Erendi

### **A mi mejor amiga, mi madre**

Juana Aguilar

### **A la persona más importante en mi vida**

Mi hijo Emanuel

**Gracias a todos por su apoyo y cariño**

## AGRADECIMIENTOS

**A la Dra. Elsa Bosquez.** Por dirigir ésta tesis, por su paciencia, por el conocimiento transmitido, por la confianza brindada, por contribuir en mi formación como profesionista y como ser humano y por fomentar en mí el valor de la responsabilidad. Fue un placer haber trabajado con usted.

**Con cariño y respeto a mis asesores, el Dr. Fernando Rivera y el Dr. Daniel Méndez.** Por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo y por sus valiosas asesorías y consejos, que me permitieron crecer y alcanzar uno de los más grandes objetivos en mi vida.

**Al Dr. Ramón Verde.** Por permitirme trabajar en su laboratorio de manera incondicional, por su paciencia y su calidad humana.

**A la Dra. Clara Pelayo, al Dr. Héctor Escalona y al Dr. Ponciano García.** Por el apoyo, recomendaciones y asesorías brindadas de manera muy oportuna e incondicional, contribuyendo de manera desinteresada en mi formación académica.

**Al Dr. Francisco Fernández Perrino.** Por resolver mis dudas a cada momento del doctorado y ser muy acertado en sus recomendaciones.

**A mis compañeros (as) y amigos (as) que conocí en la UAMI,** de los laboratorios de frutas y hortalizas, de enología y de tecnología postcosecha y biología molecular de plantas, con los que compartí grandes momentos que hicieron agradable mi estancia en ésta institución y a los que recordare con gran cariño. Leonor no me olvide de ti.

**A la Universidad Autónoma Metropolitana.** Por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en una de las mejores instituciones del país y por los apoyos otorgados durante mi estancia.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.** Por la beca **208912** otorgada para la realización de mis estudios de doctorado y que sin la cual no hubiera sido posible cumplir este objetivo.

## RESUMEN

México es el principal productor de nopal en el mundo y el único país en el que este producto se consume como una hortaliza. En países como China, Corea e Italia, existe un interés por la implementación del cultivo, ya que el nopal además de fibra contiene compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, carotenoides y polifenoles. Asimismo posee efectos farmacológicos, ya que actúa como un protector natural contra la diabetes y la osteoporosis. En México se oferta como un producto de mínimo proceso, es decir, desespinado y rebordado o en cuadritos. Sin embargo, este procesamiento ocasiona un incremento en el estrés oxidativo que se refleja como cambios en la actividad de enzimas y compuestos antioxidantes, modificándose la capacidad antioxidante del producto. Por ello se han implementado diferentes tecnologías para la conservación del nopal mínimamente procesado (NMP), tales como la refrigeración y las atmósferas modificadas (AM), que se caracterizan por retardar procesos fisiológicos como la respiración y la síntesis de etileno, conservan vitaminas, ácidos orgánicos, clorofilas y mantienen la calidad sensorial del producto.

Para contribuir al conocimiento del efecto de las AM en los procesos fisiológicos del nopal, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar: a) los sistemas antioxidantes enzimáticos: actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), b) los sistemas antioxidantes no enzimáticos: compuestos fenólicos, carotenoides, c) la capacidad antioxidante, d) las enzimas involucradas en la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos: polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina amonio liasa (PAL) y e) la identificación y cuantificación de flavonoides, en los cultivares de NMP 'Milpa Alta' y 'Atlixco', mas importantes en México por su producción y consumo.

De cada cultivar de nopal se formaron 3 lotes de 84 cladodios desespinaados, cada unidad experimental consistió de 4 cladodios y tres réplicas por tratamiento. Los nopales se envasaron en atmósfera modificada y se aplicaron los siguientes tratamientos: a) atmósfera con N<sub>2</sub> al 100%, la cual se realizó mediante un vacío parcial, posterior inyección del gas y sellado del empaque utilizando una máquina empacadora Multivac C100, b) atmósfera pasiva que consistió en la mezcla de aire atrapado durante el sellado de la bolsa y c) el testigo que consistió en NMP colocado en charolas abiertas de poliuretano. Posteriormente

todas las muestras se almacenaron a  $4\pm 1$  °C y 95% HR durante 20 días.

Los resultados obtenidos indicaron que los NMP del cultivar 'Atlixco' presentaron un sistema antioxidante enzimático (CAT y APX) más eficiente que incrementa gradualmente a través del almacenamiento y un sistema antioxidante no enzimático (fenoles y carotenoides totales) y capacidad antioxidante muy estable que permanece sin cambios significativos durante el almacenamiento, conservando los valores iniciales. Adicionalmente se observó una disminución en la actividad de la enzima PPO, mientras que la actividad de la enzima PAL solo aumentó en los NMP del grupo testigo, siendo 25% menor comparado con el cultivar 'Milpa Alta'.

Contrario a lo observado en el cultivar 'Atlixco', en los NMP del cultivar 'Milpa Alta' se observó que las enzimas antioxidantes no responden con la misma intensidad presentándose incrementos poco significativos durante todo el almacenamiento. Por otra parte, la enzima SOD mostró una disminución en ambos cultivares, se infiere que no está participando en la detoxificación de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) en la célula. Además el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante se incrementaron a través del tiempo, siendo más significativo el efecto en los NMP del grupo testigo. Finalmente, se encontró que en los dos cultivares el contenido de flavonoides no se vió modificado por efecto de la atmósferas aplicadas.

## ABSTRACT

Mexico is the main producer of cactus worldwide and the unique country in which this product is consumed as a vegetable by human being. Countries like China, Korea and Italy are interested to set this crop, since cactus stems not only contain fiber but also antioxidant compounds such as ascorbic acid, carotenoids and polyphenols. Due to its pharmacological effects, this crop has been recognized as a natural protective against diabetes and osteoporosis.

In Mexico, cactus stems are usually prepared for fresh market or wholesale by removing their spines together with little portions of tissues and cutting the edges for shaping or as trimmed in small pieces. Physical damage caused by this trimming induces production of active oxygen species (AOS) promoting the oxidative stress and triggering changes in enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, resulting in a reduction onto the antioxidant capacity. Hence, different technologies such as refrigeration and modified atmospheres (MA) can be applied to minimally processed cactus stems (MPC) in order to reduce the rate of the physiological processes such as respiration and ethylene synthesis but also preserving vitamins, organic acids and chlorophylls maintaining their freshness and sensory quality.

To understand the effect of AM on the cactus stems physiology of the two most important cultivars of Mexico ('Milpa Alta' and 'Atlixco'), the aim of this work was to determine: a) the behavior of enzymatic system through the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX), b) the changes on the non-enzymatic antioxidant system by quantifying the total content of phenolic and carotenoids c) the antioxidant capacity, d) the activities of the enzymes involved in the synthesis and oxidation of phenolic compounds: polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) and e) the quantitative identification of flavonoids.

Selected, washed and trimmed cactus stems were used forming groups of 84 MPC for each cultivar. Experimental units of 4 cladodes with three replicates were put into special bags of selective permeability to apply the following treatments: (a) A modified atmosphere with N<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>A), which was performed using a partial vacuum, followed by gas injection and subsequent sealing of the bag using a Multivac packaging machine C100; (b) A passive



atmosphere (PA) which consisted of air trapped during the sealing of the bags and (c) the control of MPC which was placed in unsealed polyurethane trays to avoid the generation of a modified atmosphere simulating the commercial form of sale of this product in Mexico. All treatments were stored at  $4 \pm 1$  °C and 95% RH for 20 days.

The results indicated that the cultivar 'Atlixco' exhibits a more efficient enzymatic antioxidant system (CAT and APX) which increased gradually throughout the storage. This cultivar also showed a non-enzymatic antioxidant system (phenols and total carotenoids) and antioxidant capacity which remained stable during storage. Additionally, it was found a decreasing activity in the PPO enzyme, whereas the PAL activity increased but only in the control group, however, it was 25% lower compared to cultivar 'Milpa Alta'.

Conversely, it was found that the antioxidant enzymes in cultivar 'Milpa Alta' do not respond with the same intensity and did not show significant increases throughout storage. Moreover, SOD enzyme activity decreased in both cultivars, it follows that it is not participating in the detoxification of the EROS in the cell. Additionally, the total phenolic content and the antioxidant capacity increased over time; this effect was more significant in the control group. Finally, both cultivars showed no changes in the flavonoid content by the applied atmospheres.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
2.1 Origen y distribución geográfica del nopal	2
2.2 Importancia Socioeconómica del nopal	3
2.3 Composición nutricional	5
2.4 Radicales libres y el estrés oxidativo	5
2.4.1 La paradoja del oxígeno	5
2.4.2 Radicales Libres y EROS	6
2.4.3 Estrés oxidativo	8
2.4.4 Ensayos para determinar el estrés oxidativo	10
2.4.4.1 Cuantificación de radicales	11
2.4.4.2 Cuantificación de marcadores del daño oxidativo (peroxidación de lípidos)	11
2.4.4.3 Cuantificación de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas	14
2.4.4.4 Cuantificación de la capacidad antioxidante	27
2.5 Oscurecimiento enzimático en productos vegetales	34
2.5.1 Polifenol oxidasa	35
2.5.2 Peroxidasa	36
2.5.3 Fenilalanina amonio liasa	36
2.6 Tecnologías de conservación postcosecha de los productos vegetales	37
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
4.1 General	41
4.2 Particulares	41

---

<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
5.1 Manejo del experimento	42
5.2 Material de empaque	42
5.3 Manejo de la muestra	43
5.4 Contenido de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> dentro del envase	43
5.5 Variables fisiológicas	43
5.5.1 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1)	43
5.5.2 Actividad de la enzima catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6)	44
5.5.3 Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX; E.C. 1.11.1.11)	45
5.5.4 Actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO; E.C.1.10.3.1)	45
5.5.5 Actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL; E.C.4.3.1.5)	46
5.5.6 Determinación de proteína	46
5.6 Variables bioquímicas	47
5.6.1 Fenoles totales	47
5.6.2 Carotenoides totales	47
5.6.3 Flavonoides	48
5.6.4 Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)	48
5.7 Análisis estadístico de los resultados	49
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
6.1 Contenido de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> dentro del envase	49
6.2 Efecto de las atmósferas modificadas en la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa	50
6.3 Efecto de las atmósferas modificadas en los compuestos antioxidantes no enzimáticos: fenoles y carotenoides totales	55
6.4 Efecto de las atmósferas modificadas sobre la capacidad antioxidante	58

---

6.5 Efecto de las atmósferas modificadas sobre la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos (PPO y PAL)	60
6.6 Efecto de las atmósferas modificadas en el contenido de flavonoides	63
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b>	<b>69</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA</b>	<b>69</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>80</b>

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales hortalizas producidas en México en 2011	4
Tabla 2. Metabolitos radicales y no radicales derivados del oxígeno	7
Tabla 3. Sistemas de defensa contra el daño oxidativo a nivel celular	15
Tabla 4. Sistemas antioxidantes presentes en plantas superiores	16
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las tres isoformas de SOD	18
Tabla 6. Clasificación de compuestos fenólicos	23

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales estados productores de nopal verdura en México.	4
Figura 2. Interconversión de las especies reactivas de oxígeno	6
Figura 3. EROS producidas por células de las plantas y sitios de producción	8
Figura 4. Mecanismo de respuesta al estrés oxidativo en células vegetales	9
Figura 5. Metodologías para la determinación de estrés oxidativo	10
Figura 6. Mecanismo de la peroxidación de lípidos y formación de productos de oxidación secundaria.	13
Figura 7. Cromóforo formado por la unión de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA).	14
Figura 8. Estructura de los ácidos L-ascórbico y L-dehidroascórbico y de sus formas isómericas	21
Figura 9. Esquema de la degradación oxidativa de la Vitamina E	22
Figura 10. Estructura de monofenoles	24
Figura 11. Estructura básica de los compuestos Flavonoides	25
Figura 12. Estructura química de algunos flavonoides agliconas típicos en <i>Opuntia</i>	26
Figura 13. Estructura general de los flavonoles	27
Figura 14. Esquema de la reacción entre el AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidino) dihidrocloruro) y un sustrato	29
Figura 15. Esquema del área bajo la curva formada entre un antioxidante y un control, para la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método ORAC	29
Figura 16. Formación del radical ABTS <sup>•+</sup> (ácido 2,2'-[3-etil benzotiazolin-6-sulfónico]), con persulfato de potasio	32
Figura 17. Reacción entre el radical DPPH <sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) y un antioxidante	33
Figura 18. Formación del complejo férrico de tripiridiltriazina (Fe <sup>2+</sup> -TPTZ)	34
Figura 19. Biosíntesis de diferentes fenólicos a través de la ruta del ácido shiquímico.	37

- 
- Figura 20. Concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza de los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 50
- Figura 21. Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 51
- Figura 22. Actividad específica de la enzima ascorbato peroxidasa en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 53
- Figura 23. Actividad específica de la enzima catalasa en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 55
- Figura 24. Contenido de fenoles totales en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 56
- Figura 25. Contenido de carotenoides totales en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 58
- Figura 26. Capacidad antioxidante en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 60
- Figura 27. Actividad específica de la enzima polifenoloxidasas en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 62
- Figura 28. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 63
- Figura 29. Cromatograma de los flavonoides presentes en nopal mínimamente procesado almacenado sin atmósfera modificada a 4±1 °C. 64
- Figura 30. Cromatograma de los estándares de los flavonoides vitexina, taxifolina, quercetina, campferol, miricetina e isoramnetina 65
- Figura 31. Área bajo la curva de los tres principales compuestos flavonoides en los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada a 4±1 °C 67

## I. INTRODUCCIÓN

El nopal es considerado en México un símbolo nacional, esta planta forma parte de la mitología azteca y se le conoce como la “planta de la vida” porque nunca se muere y a pesar de que al llegar a su estado senescente se seca puede dar origen a una nueva planta. Asimismo el nopal es endémico de América, de las 258 especies existentes 100 se encuentran en nuestro país (Ríos y Quintana, 2004).

Es importante, por sus reconocidas propiedades nutricionales y funcionales, tales como: capacidad antioxidante, efectos diuréticos, sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas, hipoglucémicas, antiulcerogénicas, anti-hiperlipidémicas y de reducción de colesterol, entre otros (Stintzing y Carle, 2005).

Con relación a la producción, México ocupa el primer lugar a nivel mundial y a nivel nacional se ha observado un incremento del 84 % durante el período 2000-2009, ocupando el cuarto lugar por volumen dentro de las hortalizas (SIAP, 2009). El consumo per cápita de esta hortaliza en 2005 fue de 7.3 kg y si únicamente se considera la población consumidora, la cual se ubica principalmente en la zona centro del país, el consumo fue de 16.3 kg. Por otro lado, las exportaciones de nopalito a los EE.UU. han crecido 128.6 %, comportamiento que se atribuye al crecimiento de la población latina y al gusto por la comida mexicana en ese país (Callejas-Juárez y col., 2009).

Sin embargo, tanto en el mercado interno como en el externo, se demanda el producto desespinado que es la presentación que se adapta a las necesidades de la vida moderna, en donde se prefieren productos prácticos para el consumo y de fácil preparación que al mismo tiempo mantengan sus características nutricionales y funcionales (Rodríguez y col., 2006).

Esto representa un problema, porque la vida de anaquel del nopal con espinas es de 5 días y una vez que se desespina y rebordea manualmente, inicia la producción del mucílago y con ello el efecto de oxidación, por lo que su vida útil se reduce (Ponce y col., 2005).

Por ello es necesario el uso de técnicas de conservación que mantengan las características de frescura en el producto, siendo la refrigeración y las atmósferas modificadas las de mayor

uso (Kader, 2007). Si bien estas tecnologías conservan el perfil de aroma del nopal verdura desespinado (Morales, 2009), se desconoce el efecto que tienen sobre la capacidad antioxidante del producto y el metabolismo asociado con la oxidación y síntesis de compuestos fenólicos (pardeamiento enzimático), en los cultivares 'Milpa Alta' y 'Atlixco' importantes por su producción y consumo.

Lo cual resulta de interés explorar por la relación que tiene la capacidad antioxidante, a nivel de tejido, con la reducción y/o inhibición del daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, características que influyen en la vida útil del producto, sus propiedades nutricionales y funcionales. Por otra parte, el proceso de pardeamiento enzimático es uno de los principales parámetros de calidad que asocia el consumidor con la calidad del producto.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Origen y distribución geográfica del nopal

El término cactus (*Cactaceae*) se refiere a un grupo de aproximadamente 1600 especies, que se clasifican en 130 géneros, los cuales se subdividen en tres subfamilias: a) *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cereoideae* (Wallace y Gibson, 2002). Los géneros comprendidos en cada una de las siguientes familias son: a) *Cereoideae* incluye los géneros *Cereus*, *Pilocereus*, *Cephalocereus*, *Phyllocactus*, *Epiphyllum*, *Echinopsis*, *Echinocereus*, *Echinocactus*, *Melocactus*, *Leuchtenbergia*, *Mammillaria*, *Pellecyphora*, *Ariocarpus*, *Pfeiffera*, *Hariota*, *Rhipsalis*, b) *Opuntioideae* que comprende a *Opuntia*, *Nopalea* y *Pterocactus*, y c) *Pereskioideae* que incluye al género *Pereskia* (Bravo, 1978).

Las principales especies usadas para la producción de nopalito son: *Nopalea cochenillifera*, *Opuntia albicarpa*, *O. ficus-indica*, *O. fuliginosa*, *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha*, *O. lindhemeiri*, *O. megacantha*, *O. undulata*, *O. tomentosa*, *O. robusta* y *O. strepthacantha* (Flores-Hernández y col., 2004).

*Opuntia ficus-indica* es la especie de mayor importancia agronómica, ya que se aprovecha en forma integral en diferentes países. En Perú y España, se siembra para el cultivo de cochinilla; mientras que en Italia y el Mediterráneo se utiliza para la producción de plantas



tuneras. México cuenta con más de 100 especies del género *Opuntia* distribuidas en todo el país; de éstas, 24 especies se utilizan para usos diversos: 15 de ellas como nopal para forraje, 6 especies se utilizan para la producción de tuna y 3 especies se utilizan para producir nopal verdura (Granados y Castañeda, 1991; ASERCA, 1999; Gallegos-Vázquez y col., 2006).

Marroquín y col. (1964), clasifican las zonas nopaleras del centro-norte de México en tres:

1. Zona nopalera Potosino-Zacatecana, con extensiones que incluyen partes territoriales de Aguascalientes, Jalisco, Durango y Guanajuato.
2. Zona nopalera del Noreste de México. Comprende la región norte de la planicie costera nororiental, o sea norte de Tamaulipas y norte y oriente de Nuevo León.
3. Zona nopalera difusa. Es la región más amplia de las tres, se extiende desde las partes calizas de San Luis Potosí, Zacatecas y Nuevo León, hasta Coahuila y partes áridas de Durango y Chihuahua.

## **2.2 Importancia Socioeconómica del nopal**

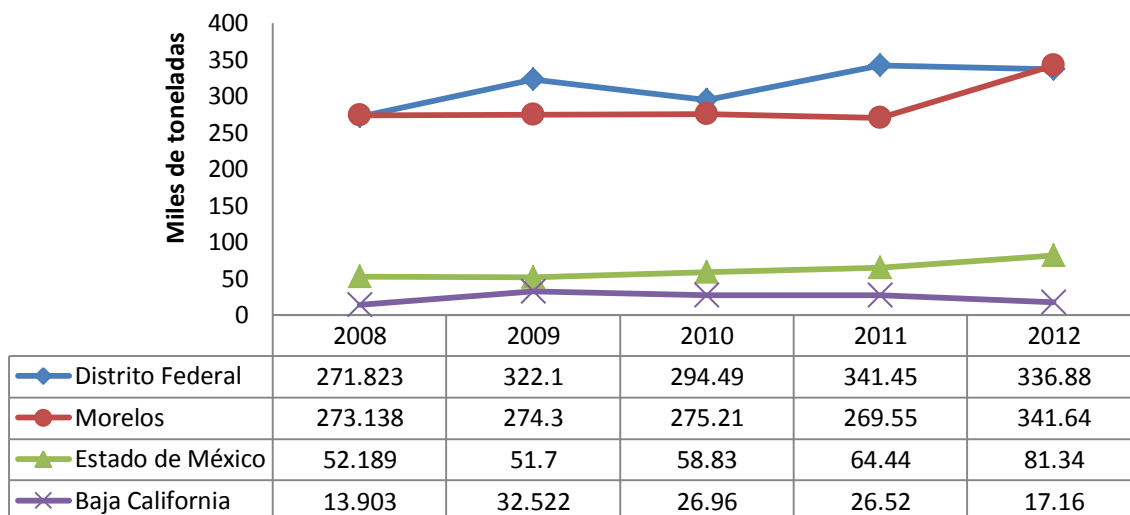
En nuestro país, el nopal verdura cuenta con una superficie sembrada de 12, 644.61 Ha., una producción de 777.41 mil toneladas y un consumo per cápita de 7.3 kg (SIAP, 2012; Callejas-Juárez y col., 2009). El nopal es una de las principales hortalizas, ubicándose en el doceavo lugar por superficie sembrada, en el cuarto lugar por el volumen de su producción y en el décimo lugar por el valor de su producción (Tabla 1).

**Tabla 1. Principales hortalizas producidas en México en 2011.**

		<b>Volumen Producción (Miles de Toneladas)</b>			<b>Valor Producción (Millones de pesos)</b>
1	Chile Verde	2126.48	1	Chile Verde	12036.80
2	Jitomate	1848.70	2	Jitomate	10111.63
3	Cebolla	1398.45	3	Cebolla	4562.95
4	<b>Nopalitos</b>	<b>777.41</b>	4	Esparrago	2805.00
5	Elote	672.31	5	Tomate Verde	2270.76
6	Tomate Verde	563.25	6	Pepino	2125.68
7	Pepino	425.16	7	Calabacita	1712.41
8	Zanahoria	404.61	8	Brócoli	1584.20
9	Calabacita	386.07	9	Elote	1355.71
10	Lechuga	370.03	10	<b>Nopalitos</b>	<b>1340.60</b>
11	Brócoli	356.97	11	Ajo	1239.70
12	Col (repollo)	2389.92	12	Lechuga	1049.38

Fuente: SIAP, 2012

Los principales estados productores de nopal verdura en México durante el período 2008-2012, se presentan en la Figura 1.



**Figura 1. Principales estados productores de nopal verdura en México.**

Fuente: SIAP, 2012

## 2.3 Composición nutricional

Como alimento, el nopal proporciona un valor nutrimental importante; por cada 100 g de producto se tiene un aporte energético de 27 kcal, 1.7 g de proteína, 0.3 g de grasa, 5.6 g de carbohidratos, 93 mg de calcio, 1.6 mg de hierro, 0.03 mg de tiamina, 0.06 mg de riboflavina, 0.03 mg de niacina, 22 mg de ácido ascórbico y 41  $\mu\text{g}/\text{eq}$  de retinol (Sáenz, 2004).

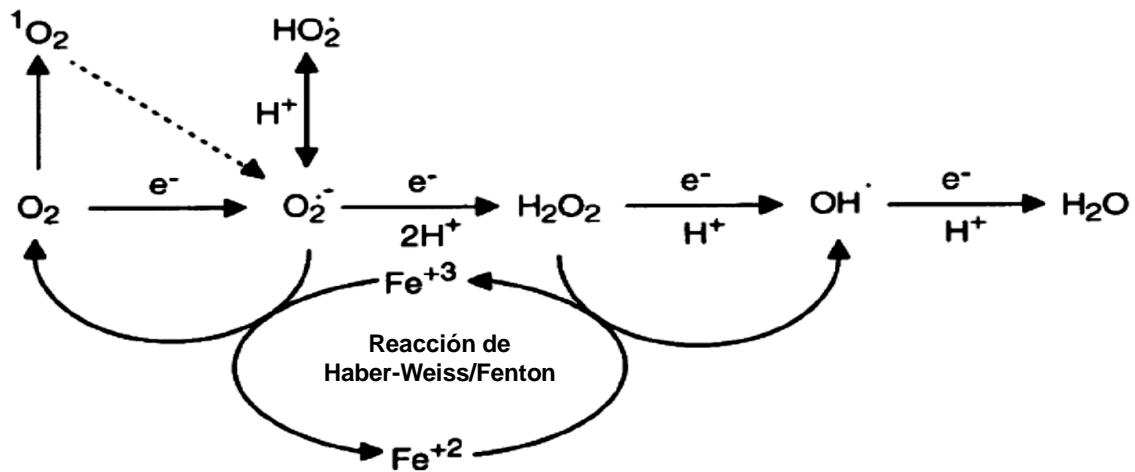
## 2.4 Radicales libres y el estrés oxidativo

### 2.4.1 La paradoja del oxígeno

El oxígeno es el segundo compuesto más abundante en la tierra (21 % del gas presente en la atmósfera) y también es indispensable para que se lleve a cabo la respiración y los procesos metabólicos en los organismos aerobios (Purvis, 2004).

Paradójicamente, el oxígeno es causante de la oxidación de los constituyentes celulares que da como resultado la pérdida de funciones de los organelos y la muerte celular. Este peligro del oxígeno es inherente a su estructura, lo que ocurre es que cada átomo de oxígeno tiene un par de electrones no compartidos además de ser el segundo átomo más electronegativo (dentro de la tabla periódica de los elementos químicos) solo después del Flúor, esto hace que los átomos de oxígeno tengan la facilidad de sustraer electrones de moléculas o átomos con electrones disponibles, generando así los radicales libres derivados de oxígeno. La reducción tetravalente del oxígeno en la mitocondria para producir agua mediante la cadena de transporte de los electrones es relativamente segura; sin embargo, la reducción univalente del oxígeno genera especies reactivas de oxígeno (EROS) (Figura 2).

El ambiente reductivo celular favorece reducciones univalentes del oxígeno no programadas. Así, en un ambiente aeróbico, se produce el peróxido de hidrógeno, un radical aniónico superoxidado, y el radical hidroxilo, que es extremadamente reactivo, ambos se consideran responsables de la toxicidad del oxígeno (Pérez, 2000).



**Figura 2. Interconversión de EROS derivadas de  $O_2$ .**

Fuente: Vranová y col., 2002.

El estado completo del oxígeno molecular ( $O_2$ ) puede ser activado por el exceso de energía, mediante la reversión del spin de uno de los electrones desapareados para formar oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Alternativamente, una reducción del electrón permite la formación de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). El  $O_2^{\bullet-}$  existe en equilibrio con su ácido conjugado, formando el radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ). En el siguiente paso se forma peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y agua ( $H_2O$ ). Los iones metálicos presentes en la célula que están en la forma oxidada ( $Fe^{3+}$ ) son reducidos en presencia de ( $^1O_2$ ) y consecuentemente pueden catalizar la conversión de  $H_2O_2$  a  $OH^{\bullet}$  por la reacción de Fenton o Haber-Weiss (Vranová y col., 2002).

#### 2.4.2 Radicales Libres y EROS

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón ( $e^-$ ) desapareado por lo que son muy reactivos, ya que tienden a capturar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electrónica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daño oxidativo desde células hasta tejidos

(Ramos y col., 2006). Por otra parte, las especies reactivas (ER), se forman como productos del metabolismo de los RL y aunque no todas son de esta clase, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para la célula. Las ER incluyen a las de oxígeno (EROS), hierro (RIS, por sus siglas en inglés), cobre (RCS), así como a las de nitrógeno (RNS). En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio homeostático de la célula (Rodríguez y col., 2001).

Tanto los RL como las EROS (Tabla 2), pueden ser generados de forma endógena como subproductos del metabolismo energético, reacciones enzimáticas con xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa, o respuesta hormonal. De manera exógena, durante la exposición a radiaciones y/o condiciones ambientales (Kyung y col., 2007).

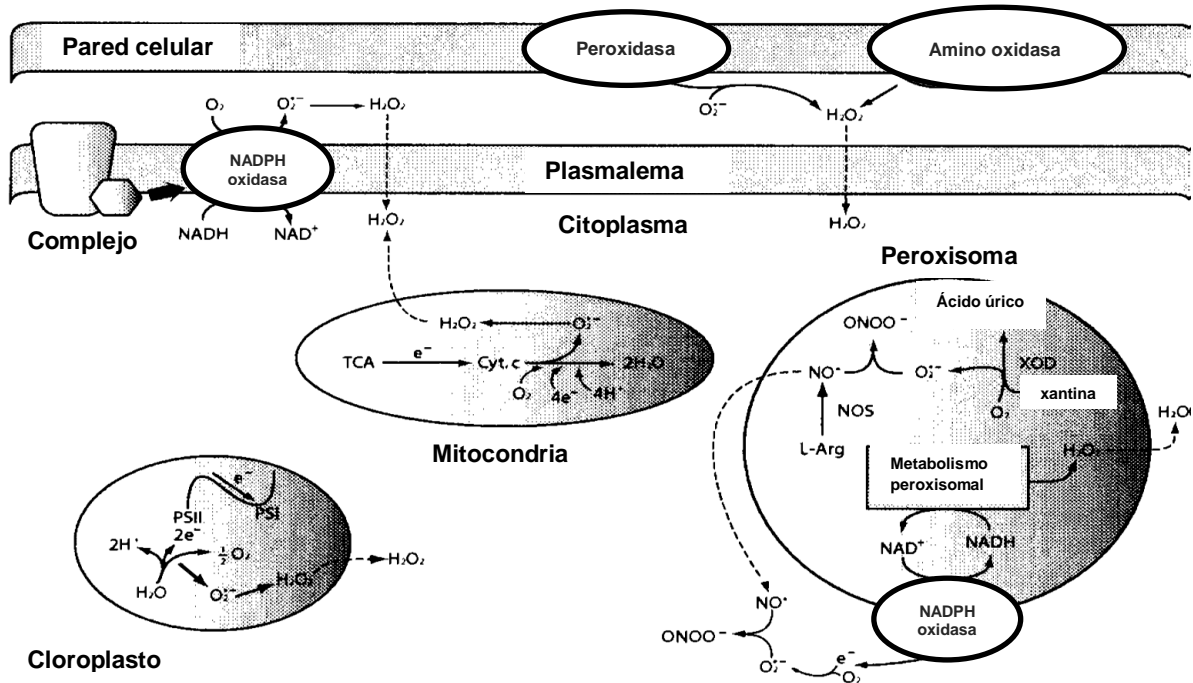
Estos procesos ocurren de manera natural en cantidades moderadas y son usados como mecanismos de protección contra bacterias y virus; su producción es neutralizada fácilmente por el propio sistema en que se generan. Las EROS tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) son relativamente estables; sin embargo, si se acumulan pueden ser precursores de uno o más EROS tóxicas, tales como el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el cual está ligado a la peroxidación de lípidos y degradación de membranas (Toivonen, 2004).

**Tabla 2. Metabolitos radicales y no radicales derivados del oxígeno.**

Radicales derivados de oxígeno		No-Radicales derivados de oxígeno	
Oxígeno (birradical)	$O_2^{\cdot\cdot}$	Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$
Ion superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Ácido hipocloroso	HOCl
Hidroxilo	$OH^{\cdot}$	Ozono	$O_3$
Peroxilo	$ROO^{\cdot}$	Aldehídos	HCOR
Alcoxilo	$RO^{\cdot}$	Oxígeno singulete	$^1O_2$
Óxido nítrico	$NO^{\cdot}$	Peroxinitrito	ONOOH

Fuente: Kohen y Nyska, 2002.

A nivel celular existen tres sitios donde se generan las EROS en las plantas (Figura 3): 1) Región apoplástica, que incluye a la pared celular, el espacio apoplástico y la superficie externa de la membrana, 2) Citoplasma y 3) Organelos celulares (cloroplastos, mitocondria y peroxisomas/glioxisomas) (Mittler, 2002). Sin embargo, en postcosecha los cloroplastos no son un sitio importante de generación de EROS, solo lo son durante la cosecha y en el pre-enfriamiento (Toivonen, 2004).



**Figura 3. EROS producidas por células de las plantas y sitios de producción.**

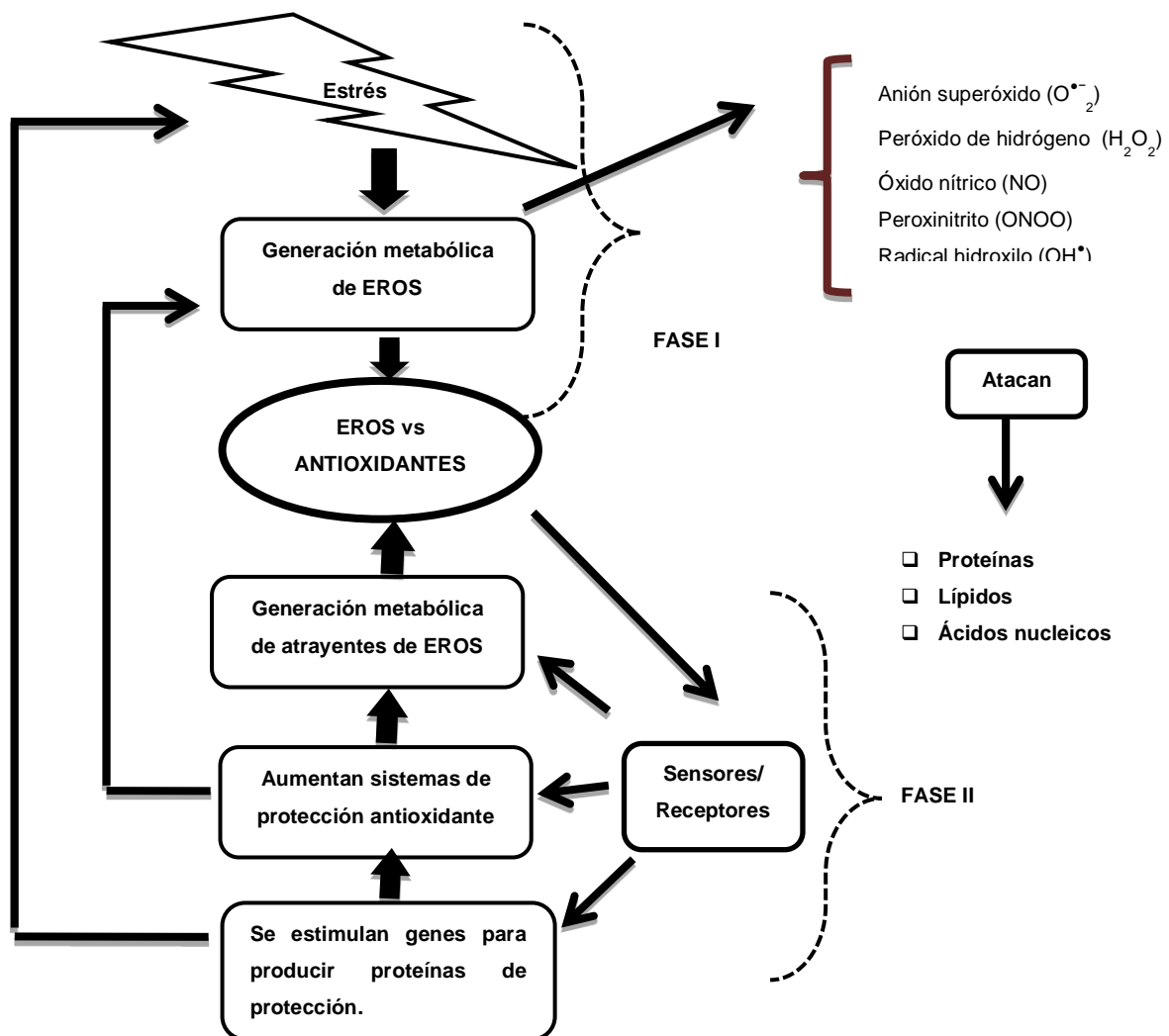
$H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno;  $O_2^-$ : Anión superóxido; PSII: Fotosistema II; PSI: Fotosistema I; TCA: Ciclo del ácido tricarboxílico; Cyt C: Citocromo C,  $ONOO^-$ : Radical Peroxinitrito;  $NO^•$ : Óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintasa; XOD: Xantina oxidasa; L-Arg: L-arginina

Fuente: Toivonen, 2004.

### 2.4.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EOx) ocurre cuando la generación de EROS excede la capacidad de la planta para mantener la homeostasis celular. En las plantas los síntomas típicos de estrés oxidativo son la inhibición del desarrollo de cloroplastos, desórdenes postcosecha como escaldado superficial, oscurecimiento externo, daño en membranas, degradación de pigmentos, inactivación de proteínas funcionales, lesiones y mutaciones de ácidos nucleicos (Hodges, 2004). En el tejido vegetal, el estrés oxidativo ocurre en tres fases, como se

describe en la Figura 4. En la primera fase, se genera una señal de alarma (en presencia de factores bióticos o abióticos distintos a las condiciones habituales del producto) e inicia con ello la producción de EROS, esta acumulación es monitoreada y regulada por sensores y receptores en la célula y como consecuencia de este proceso se inician modificaciones en el metabolismo del tejido, que incluye incrementos en los sistemas de protección antioxidante (enzimáticos y no enzimáticos) así como modificaciones en los genes que provocan cambios en el metabolismo, para responder de una mejor manera frente al estrés (Fase II). Sin embargo, si el estrés continúa o los niveles son extremos y el sistema no puede contrarrestarlo se producirá daño celular y subcelular (Toivonen, 2004).

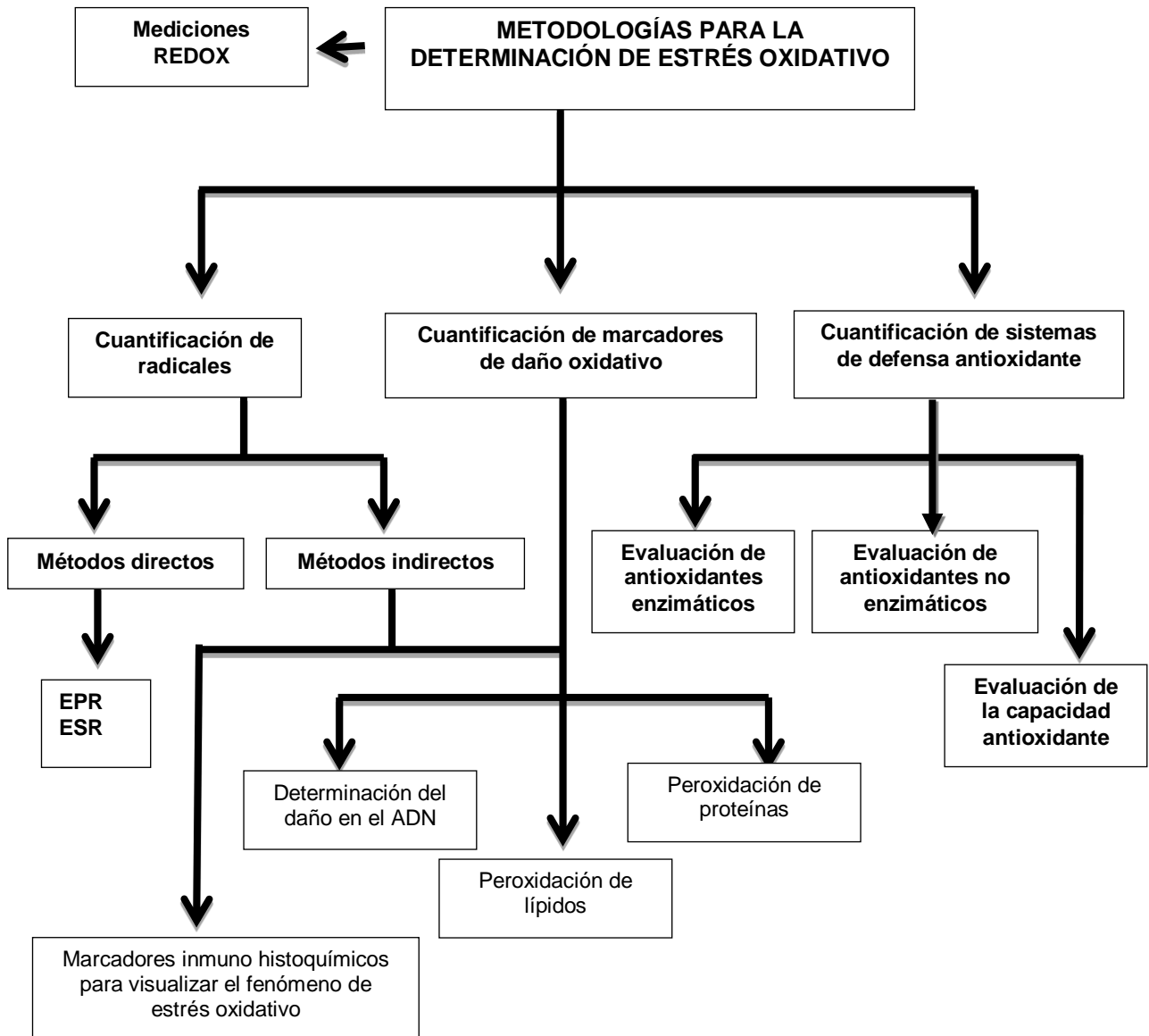


**Figura 4. Mecanismo de respuesta al estrés oxidativo en células vegetales.**

Fuente: Toivonen, 2004.

#### 2.4.4 Ensayos para determinar el estrés oxidativo

Debido a que las EROS participan en diversos procesos bioquímicos, resulta importante cuantificar los daños que producen cuando se pierde la homeostasis celular, proceso conocido como estrés oxidativo. En la Figura 5, se describen las principales metodologías para evaluar el estrés oxidativo.



**Figura 5. Metodologías para la determinación de estrés oxidativo.**

Fuente: Kohen y Nyska, 2002.



#### 2.4.4.1 Cuantificación de radicales

##### 1) Ensayos químicos

###### a) Medición química del radical hidroxilo

Para evaluar el daño causado por el radical hidroxilo, es necesario detectar, identificar y cuantificar el radical. Algunos de los métodos más simples y ampliamente usados para la medición del radical hidroxilo son los siguientes (Rice-Evans y col., 1991):

- **Ensayo de desoxirribosa para la detección y producción del radical hidroxilo en sistemas celulares.** En esta prueba la desoxirribosa es degradada por el radical hidroxilo, produciendo malondialdehído que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), generando un cromóforo rosa que se absorbe a 532 nm (Rice-Evans y col., 1991).
- **Hidroxilación del salicilato (medición de 2,3-dihidroxi-benzoato).** Este ensayo fue propuesto por Halliwell (2007), se basa en la hidroxilación aromática para la producción de radicales  $\text{OH}\cdot$ . Los productos hidroxilados son cuantificados usando un método colorimétrico que mide fenoles o-dihídricos (Rice-Evans y col., 1991).

###### b) Medición química del radical superóxido

- **Reducción de nitroazul de tetrazolio.** La reducción del compuesto nitroazul de tetrazolio (NBT) (color amarillo pálido) por un anión superóxido para obtener formazán (color azul oscuro), es aplicada como una prueba de generación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en sistemas biológicos. En esta prueba el oxígeno es rápidamente reducido vía el complejo NADPH-oxidasa, dicho sistema comprende una flavoproteína y un citocromo tipo b. El citocromo tiene un punto medio de bajo potencial, que permite la transferencia catalítica de electrones de NADPH a oxígeno, dando lugar a la producción de superóxido (Rice-Evans y col., 1991).

#### 2.4.4.2 Cuantificación de marcadores del daño oxidativo (peroxidación de lípidos)

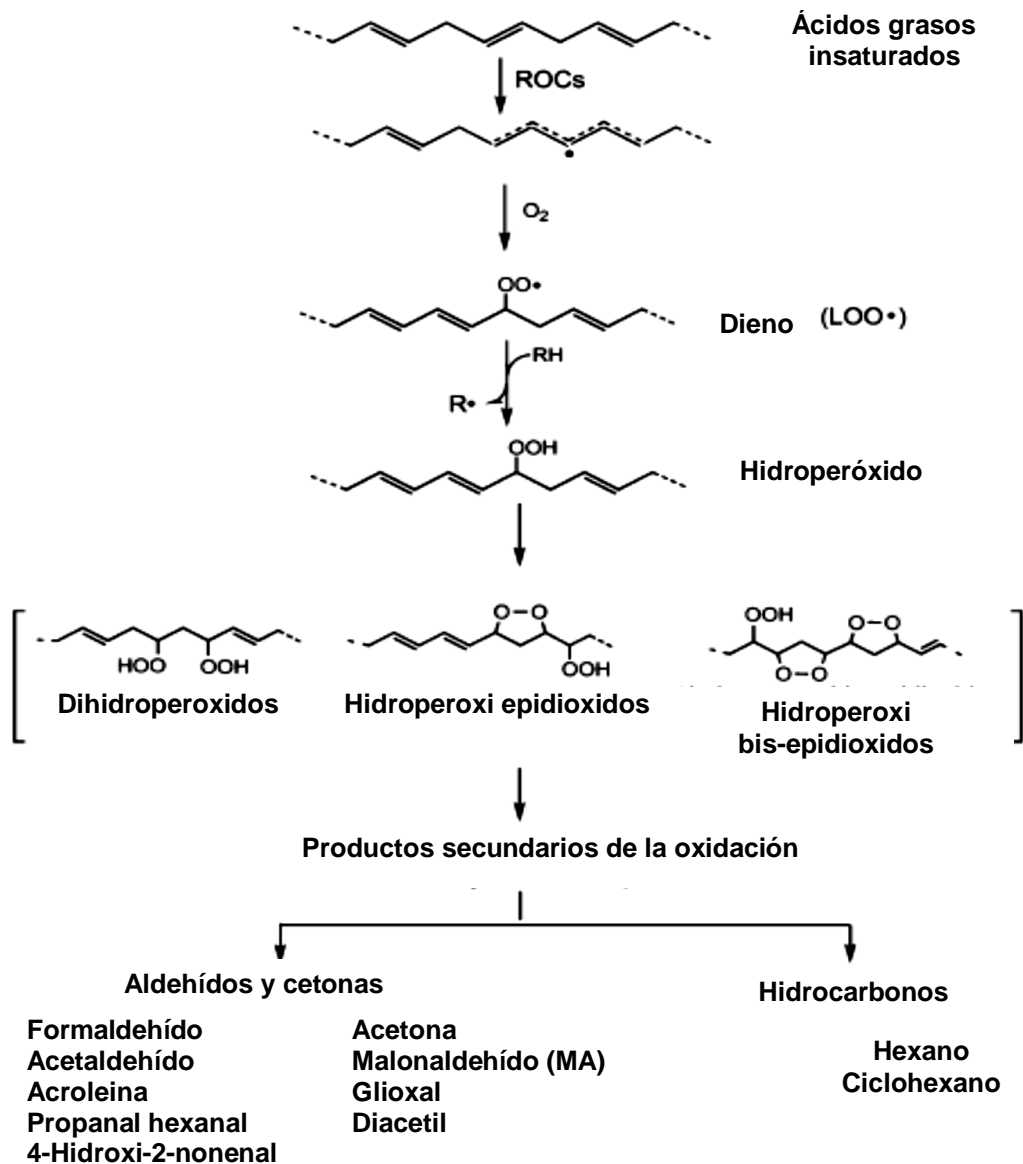
Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La

estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica, la cual ocurre en tres fases como se muestra en la Figura 6 (Avello y Suwalsky, 2006).

**1. Fase de iniciación.** Un radical libre ataca a un carbono de la cadena lateral de un ácido graso poliinsaturado, ocurre la pérdida de un hidrógeno del grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y con ello la formación de un radical (radical carbonilo) (Joony Takayuki, 2009).

**2. Fase de propagación.** Ocurre una reacción en cadena con la extensión del daño y la formación de más radicales. El radical formado en la primera fase reacciona con el oxígeno y forma un radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ) que puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes y originar un hidroperóxido o lipoperóxido ( $\text{LOOH}$ ) y un radical carbonilo y así se produce una reacción en cadena y el daño a un número creciente de ácidos grasos (Joon y Takayuki, 2009).

**3. Fase de terminación o descomposición.** Los hidroperóxidos formados se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Los aldehídos formados, como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, generando efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos. Sin embargo, en presencia de metales de transición se puede catalizar la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos presentes en sistemas biológicos en radicales peroxilo y alcoxilo que pueden provocar la sustracción de átomos de hidrógeno y formar hidroperóxidos e hidróxidos nuevamente, reiniciándose el proceso de peroxidación de lípidos (Joony Takayuki, 2009). La medición o cuantificación del malondialdehído (MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha utilizado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Joon y Takayuki, 2009).

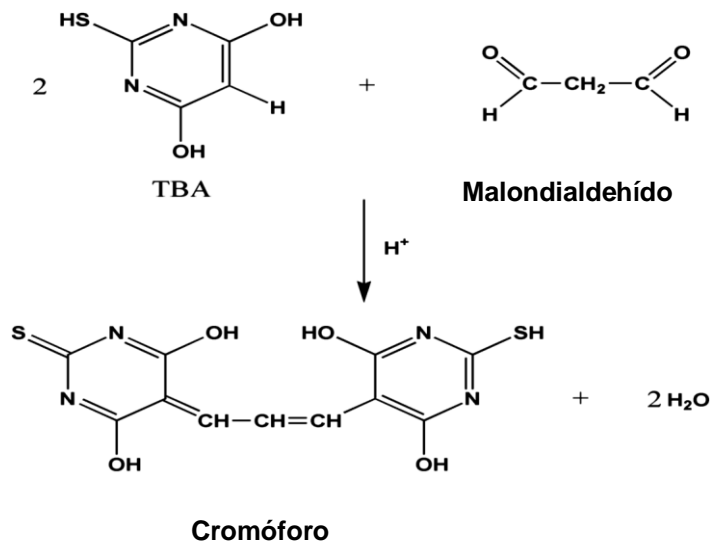


**Figura 6. Mecanismo de la peroxidación de lípidos y formación de productos de oxidación secundaria.**

Fuente: Joon y Takayuki, 2009.

Para la cuantificación del MDA, el ensayo más usado es el del ácido tiobarbitúrico (TBA), donde entran en contacto ambos compuestos en una proporción 1:2 respectivamente, formando un aducto MDA-TBA que produce una coloración rojo fluorescente en solución, con un máximo de absorbancia a 532 nm (Figura 7). Sin embargo, en este ensayo también intervienen otros compuestos como monosacáridos, disacáridos, análogos del MDA como el acetaldehído y algunas otras sustancias derivadas de la peroxidación que son capaces de

reaccionar con el TBA, por lo que este ensayo es conocido como especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Du y Bramlage, 1992).



**Figura 7. Cromóforo formado por la unión de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA).**

Fuente: Du y Bramlage, 1992

#### 2.4.4.3 Cuantificación de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas

La célula vegetal utiliza al menos dos mecanismos diferentes para regular la concentración intracelular de EROS: a) el primer mecanismo debe ser capaz de mantener reducidos los niveles de EROS, que serán utilizados en procesos de señalización y b) el segundo mecanismo debe ser capaz de detoxificar el exceso de EROS, especialmente durante condiciones de estrés (Mittler, 2002).

Con respecto a los mecanismos mencionados, en el primer caso se encuentran los antioxidantes no enzimáticos, mientras que en el segundo se encuentran los sistemas enzimáticos. La función de algunos sistemas antioxidantes se muestra en la Tabla 3 (Hodges y col., 1997).

Tabla 3. Sistemas de defensa contra el daño oxidativo a nivel celular.

<b>1. Antioxidantes preventivos: Suprimen la formación de radicales libres</b>	
<b>a) <u>Descomposición de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno</u></b>	
Catalasa	Descomposición de peróxido de hidrógeno $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutación peroxidasa (celular)	Descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de ácidos grasos libres $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Hidroperóxido lipídico y Glutación peroxidasa	Descomposición de hidroperóxidos fosfolipídicos
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \longrightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$
Glutación-S-transferasa	Descomposición de hidroperóxidos lipídicos
<b>b) <u>Moderación de oxígeno activo</u></b>	
Superóxido dismutasa (SOD)	Dismutación del superóxido $2\text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Carotenoides y Vitamina E	Moderación de oxígeno singlete
<b>2. Antioxidantes captadores de radicales: Captan radicales inhibiendo la cadena de iniciación y rompiendo la cadena de propagación en la peroxidación lipídica</b>	
Hidrosoluble	Vitamina C
Liposoluble	Vitamina E, carotenoides, flavonoides

Fuente: Pokorny y col., 2001.

**1) Antioxidantes enzimáticos**

Los radicales libres formados durante el metabolismo celular normal son capaces de inducir un amplio rango de reacciones severamente dañinas. Para evitar tal efecto deteriorativo, las plantas han desarrollado mecanismos de protección muy eficientes a través de los antioxidantes enzimáticos (Madhavi y col., 1996). En la Tabla 4, se describe la localización de tres enzimas antioxidantes [superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y

la catalasa (CAT)] cuyo balance en su actividad es crucial para mantener los niveles adecuados del radical superóxido y de peróxido de hidrógeno (Mittler, 2002).

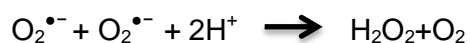
**Tabla 4. Sistemas antioxidantes presentes en plantas superiores.**

Localización subceluar	Tipo de EROS	Fuente de EROS	Sistemas enzimáticos que atrapan EROS	Productos	Sistemas no enzimáticos que atrapan EROS
Cloroplastos	Superóxido H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PSII Enzimática	SOD Ascorbato peroxidasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Dehidroascorbato GSH NAPH+	Carotenoides Xantofilas
Mitocondria	Superóxido H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Transporte de electrones Enzimática	SOD  Peroxidasa CAT (CAT- 3-maiz)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>	
Citoplasma	Superóxido H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Enzimática	SOD CAT Peroxidasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Glioxisomas y Peroxisomas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	β-oxidación Fotorespiración	CAT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>	

Fuente: Scandalios, 2003

#### a) Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

La enzima superóxido dismutasa es la primera defensa que usa el tejido en contra del anión superóxido, actúa catalizando la transformación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) de acuerdo con la reacción (Fox, 1991; Polle, 2001):



Se conocen tres isoformas de SOD:

**1. SOD Cu/Zn:** Es un dímero de peso molecular aproximado a 32000 Da, las dos subunidades son químicamente idénticas y se asocian por interacciones no covalentes y son estabilizadas por enlaces disulfuro. La enzima contiene un Cu<sup>2+</sup> y un Zn<sup>2+</sup> por subunidad, el

$\text{Cu}^{2+}$  es responsable de la transferencia de electrones, mientras que el  $\text{Zn}^{2+}$  estabiliza la enzima. Estas son proteínas estables, que se encuentran en el citoplasma y en cloroplastos en células eucariotas (Madhavi y col., 1996).

**2. SOD que contiene Mn (MnSODs).** Esta enzima fue aislada por primera vez de *E. coli*, reportándose una masa molecular relativa de 40 000 Da, actualmente se ha obtenido de diversas fuentes, tales como vegetales, animales, bacterias y se ha reportado que se ubican en la matriz de la mitocondria, así como en células procariontas.

Las MnSODs aisladas de organismos superiores se forman de 4 subunidades de proteína con 0.5-1 iones de manganeso por subunidad (Madhavi y col., 1996).

La remoción del manganeso del sitio activo de esta enzima (MnSOD), provoca la pérdida de su actividad catalítica. Generalmente, no se puede recuperar la funcionalidad de la enzima reemplazando el Mn por otro metal de transición, incluyendo hierro (Madhavi y col., 1996).

Las MnSOD catalizan las mismas reacciones que las Cu/ZnSOD, pero son menos activas en un pH alto. Además, las MnSOD son susceptibles a la desnaturalización por calor o química, tales como detergentes, pero no se ven afectadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Madhavi y col., 1996).

**3. SOD que contienen Fe (Fe SOD).** Las FeSOD, son generalmente proteínas dimericas y cada subunidad tiene una masa molecular de 22 000 Da y contienen un ion hierro funcional. La FeSOD presenta un alto grado de homología en su secuencia con MnSOD y su actividad se ve inhibida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a un elevado pH (Madhavi y col., 1996).

En la Tabla 5, se presentan las propiedades fisicoquímicas de las tres formas metálicas de la enzima SOD:

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las tres isoformas de SOD.

Propiedades	Cu/Zn SOD	Mn SOD	Fe SOD
<b>Forma molecular</b>	Dímero, subunidades idénticas	Dímero en procariotas, tetrámero en eucariotas. Subunidades idénticas	Dímero y ocasionalmente tetrámero, subunidades idénticas
<b>Ion metálico (grupo prostético)</b>	Un Cu <sup>2+</sup> y un Zn <sup>2+</sup> por subunidad	Uno o dos Mn <sup>2+</sup> por dímero	Un Fe <sup>3+</sup> por subunidad
<b>Peso molecular (Da)</b>	32000	42000-46000 (dímero)	40000-46000 (dímero)
<b>Inhibición por cianidina</b>	Con 1 mM CN <sup>-</sup>	No hay efectos	No hay efectos
<b>Inhibición por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Con 0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No hay efectos	Con 0.5 M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Inhibición por cloroformo/etanol</b>	No hay efectos	Inhibida	Inhibida
<b>Efecto de pH sobre la actividad enzimática</b>	No hay efectos, pH 5-10	Actividad decrece en pH>8	Actividad decrece en pH>8

Fuente: Madhavi y col., 1996.

### b) Enzimas cuyo sustrato es el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Las enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT), tienen como sustrato el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sin embargo, su afinidad con éste es diferente para cada una de ellas, siendo en el orden de µM (APX) y mM (CAT) y esto se debe a que tienen diferentes funciones a pesar de compartir un mismo sustrato, de tal manera que la APX puede ser responsable de la regulación de EROS relacionadas con el proceso de señalización; mientras que la CAT es responsable de la remoción del exceso de EROS durante condiciones de estrés (Mittler, 2002).



**Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)**

La catalasa es una enzima óxido-reductasa, que se localiza en peroxisomas, la cual protege a la célula de la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a través de dos reacciones (Bergmeyer, 1974):

**1) Mediante la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (actividad de catalasa)**

**2) Como oxidante**, en este caso ocurre una oxidación de compuestos donadores de hidrógeno, tales como, metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles; en esta reacción se consume 1 mol de peróxido (**actividad peroxidasa**) (Roberfroid y Buc, 1995).



Donde R actúa como sustrato

La CAT es estable a bajas temperaturas, alcanzando su máxima actividad a  $30^\circ\text{C}$ ; por otra parte, puede ser inhibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{CN}^-$  y  $\text{N}_3^-$  (Fox, 1991).

**Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)**

La enzima ascorbato peroxidasa (APX), se encuentra presente en los cloroplastos, la mitocondria, el citoplasma y en la región apoplástica (Toivonen, 2004). La APX, es una peroxidasa de la clase I, esta enzima cataliza el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producto de la oxidación del ascorbato en las plantas, algas y ciertas cianobacterias, de acuerdo con la siguiente reacción (Raven, 2003):



Esta enzima es indispensable para proteger a los cloroplastos y otros constituyentes celulares del daño causado por el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Asada (1992), reportó la presencia de dos isoenzimas de APX en hojas de té:

Una isoenzima cloroplástica, cuya función es atrapar peróxido de hidrógeno y otra citosólica que es la isoenzima más abundante en organismos no fotosintéticos

De acuerdo con Asada (1992) la isoenzima cloroplástica presenta las siguientes diferencias, con respecto a la isoenzima citosólica. La isoenzima cloroplástica tiene una corta vida en un medio carente de ascorbato, presenta mayor sensibilidad a reactivos de tiol y una mayor especificidad por el ascorbato, como sustrato donador de electrones.

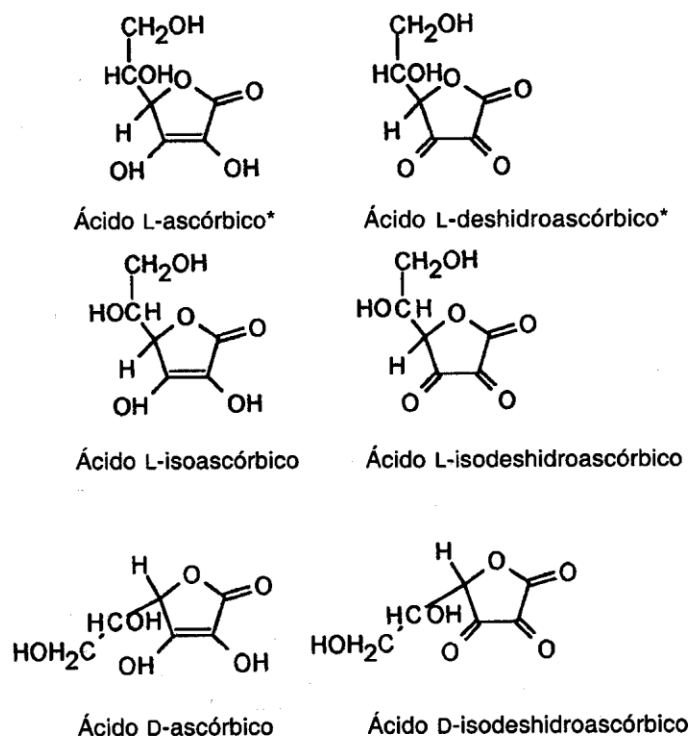
Por otra parte, Orvar y Ellis (1997) reportaron que una inhibición de la APX en citoplasma incrementa la sensibilidad del tejido de tabaco al ozono, mientras que una sobreexpresión de APX en peroxisoma aumenta la resistencia al peróxido de hidrógeno (Wang y col., 1999).

## **2) Antioxidantes no enzimáticos**

Se clasifican en hidrofílicos e hidrofóbicos, y algunos de ellos actúan como vitaminas y por tanto son indispensables para el metabolismo celular (Toivonen, 2004). De acuerdo con Stintzing y Carle (2005), en nopal los antioxidantes no enzimáticos son:

### **a) Vitamina C**

Es un compuesto hidrosoluble, considerado un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos. El ácido ascórbico reacciona fácilmente con los radicales libres que pasan a ser radicales ascorbilo; éstos rápidamente se descomponen para producir ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico. A través de estas reacciones la vitamina C captura radicales libres potencialmente tóxicos, como el superóxido o hidroxilos y regenera el tocoferol a partir de los radicales tocoferilo. Se ha sugerido que el ácido ascórbico podría interaccionar con los radicales urato o tocoferilo para regenerar las especies reducidas de cada una de ellas (Figura 8), con lo que la vitamina C actuaría, además de antioxidante como regenerador de otros antioxidantes fisiológicos (Madhavi y col., 1996; Biruete-Guzmán y col., 2009). La vitamina C, se absorbe por transporte activo y por difusión pasiva. La forma oxidada del ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico, se absorben más fácilmente ya que el pH fisiológico no se encuentra ionizado, es menos hidrofílico y por tanto, atraviesa mejor las membranas celulares (Biruete-Guzmán y col., 2009).



**Figura 8. Estructura de los ácidos L-ascórbico y L-dehidroascórbico y de sus formas isómeras (los asteriscos indican que poseen actividad de Vitamina C).**

Fuente: Damodaran y col., 2010

## b) Vitamina E

También llamada tocoferol o  $\alpha$ -tocoferol (abundante en los alimentos), es un potente antioxidante liposoluble que protege la integridad de las membranas celulares. Todos los tocoferoles y los tocotrienoles contienen un anillo aromático que contiene grupos hidroxilo lo que les permite actuar como antioxidantes (Figura 9). El electrón desapareado donado por un átomo de hidrógeno se “deslocaliza” en la estructura de anillo del tocoferol convirtiéndose en una especie relativamente estable y no reactiva. Las reacciones en cadena iniciadas por los radicales hidroxilo pueden detenerse con la formación de radicales estables como resultado de la interacción con la vitamina E, su acción antioxidante se incrementa en presencia de Zinc (Pokorny y col., 2001; Biruete-Guzmán y col., 2009).

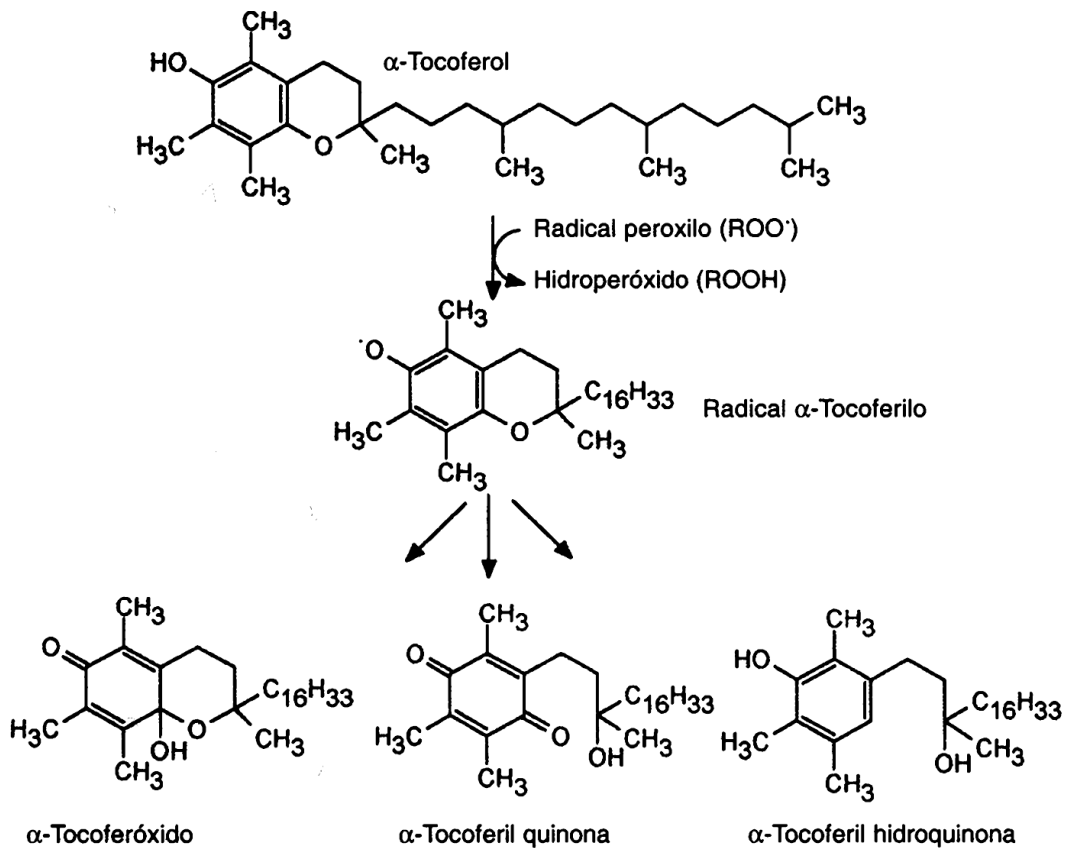


Figura 9. Esquema de la degradación oxidativa de la Vitamina E.

Fuente: Damodaran y col., 2010

### c) Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos, que están presentes en el reino vegetal. Se localizan en la vacuola en forma libre o ligada a carbohidratos (glucosa, galactosa, ramnosa, manosa y rutinosa (Dicko y col., 2006).

El precursor de los fenólicos es el ácido shiquímico y en algunos casos, como el de los flavonoides, resultan de la combinación de dos rutas: la del ácido shiquímico y la del malonil-CoA. Debido a que son un grupo muy diverso, han sido clasificados con relación al número de carbonos presentes en su molécula (Tabla 6) (Harborne y Simmonds, 1964).

Tabla 6. Clasificación de compuestos fenólicos.

No. de átomos de carbono	Esqueleto base	Clase
6	C <sub>6</sub>	Fenoles simples, benzoquinonas
7	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos
8	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	Acetofenonas, ácido fenilacético
9	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	Ac. Hidroxicinámico, polipropeno cumarina, Isocumarina
10	C <sub>6</sub> - C <sub>4</sub>	Naftoquinona
13	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub>	Xantonas
14	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>	Estilbeno, antraquinona
15	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>	Flavonoides, isoflavonoides
18	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós, neolignanós
30	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides
N	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas
	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catecolmelanina
	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados

Fuente: Vermerris y Nicholson, 2006

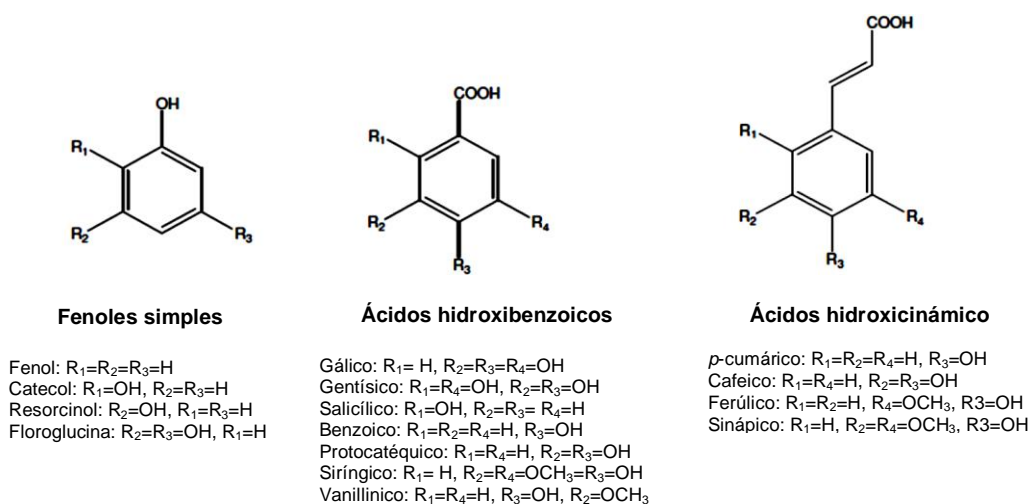
El comportamiento o acción antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones pueden promover reacciones de oxidación *in vitro* (Mustafa y col., 2010).

Para que un compuestos fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas: a) En una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado, pueda retrasar o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre y b) el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores. Entre los compuestos fenólicos con una reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos, taninos, chalconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos (Martínez y col., 2000).

En vegetales predomina la presencia de dos grandes grupos: a) Los fenoles simples y ácidos fenólicos y b) Los flavonoides, cuyas características se describen a continuación.

## Fenoles simples y ácidos fenólicos

Los fenoles simples son relativamente raros en vegetales, además, estos compuestos son indeseables en alimentos porque son carcinogénicos y hepatotóxicos. Por otra parte, se encuentran los ácidos fenólicos, estos tienen un solo anillo y por regla general se hallan presentes en forma de derivados (Belitz y Grosch, 1997), incluyen dos grupos que son: a) Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) y b) los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico (gálico, protocatecuico, gentísico, etc.), la estructura de estos compuestos se muestra en la Figura 10 (Dicko y col., 2006).

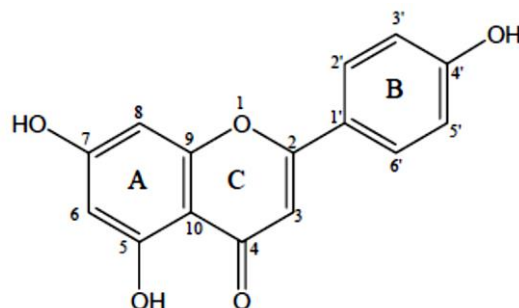


**Figura 10. Estructura de monofenoles.**

Fuente: Dicko y col., 2006

## Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los polifenoles, están conformados por dos anillos unidos por un anillo heterocíclico, son de bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenil pirano y se caracterizan por poseer una configuración C6-C3-C6 (Figura 11), por lo que pueden actuar donando hidrógeno, captando radicales o quelando metales (Pokorny y col., 2001). Son importantes por su efecto antioxidante, como anticancerosos, antitrombóticos y como reductores de la concentración de colesterol (Birnete-Guzmán y col., 2009).



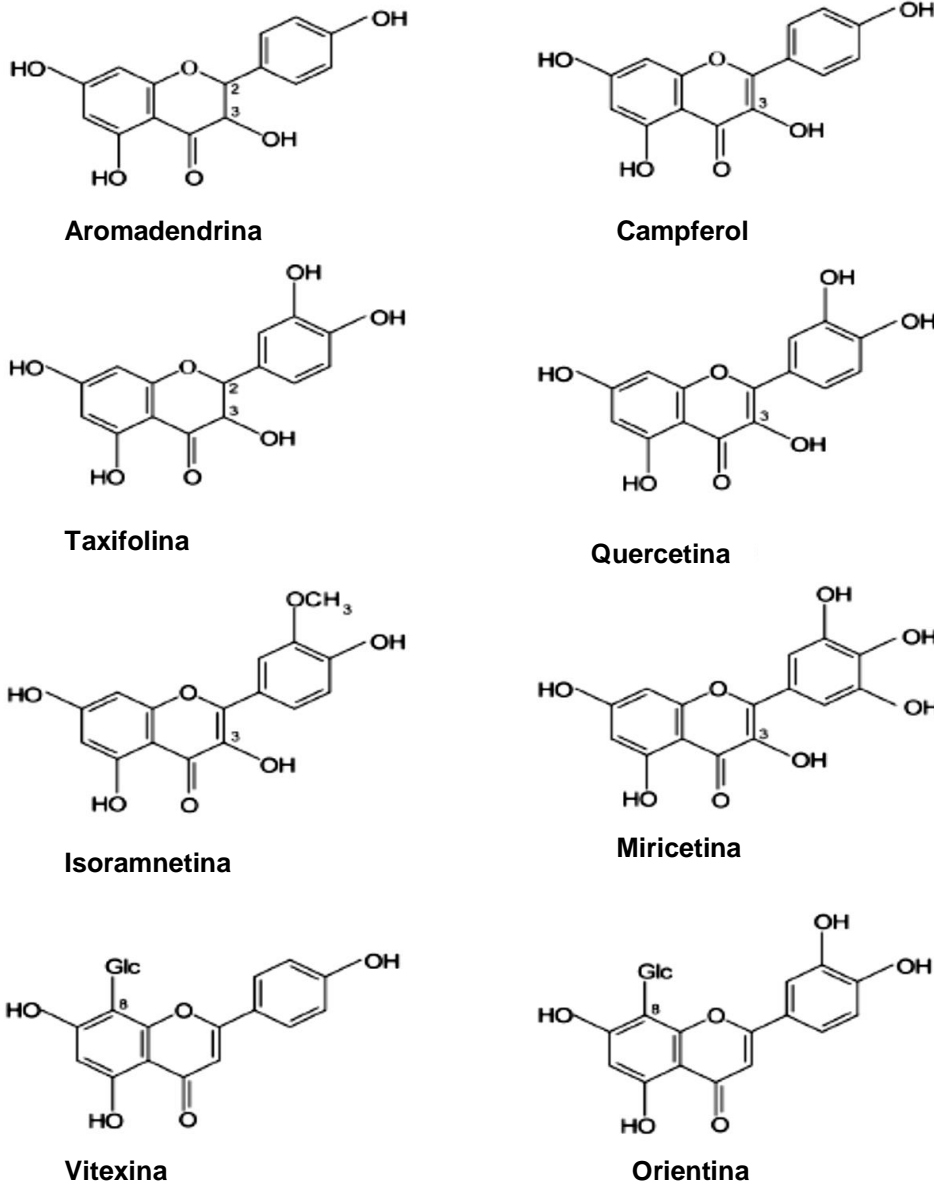
**Figura 11. Estructura básica de los compuestos Flavonoides.**

Fuente: Vermerris y Nicholson, 2006

La estructura básica de los flavonoides les permite presentar una multitud de sustituciones y variaciones dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanolles, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalcona, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandioli, proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos ellos, las flavonas (apigenina, luteolina y diosmetina) y los flavonoles (quercetina, miricetina, campferol) son los compuestos más abundantes en los vegetales (Martínez y col., 2000).

Asimismo, estos compuestos poseen una alta reactividad frente al radical hidroxilo. Por ejemplo la (+)- catequina, (-)-epicatequina, la 7-8 hidroxiflavona y la rutina atrapan de 100 a 300 veces más radicales hidroxilo que el manitol, un típico secuestrador de radicales hidroxilo; la reactividad de los flavonoides hacia los grupos hidroxilo es mayor que hacia el anión superóxido, también reaccionan con el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), tales como el galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), la (-)-epigallocatequina (EGC) y la (-)-epicatequina (EC) (Pokorny y col., 2001).

Con relación al nopal, Stintzing y Carle (2005) reportaron la presencia de isoramnetina 3-glucósido, isoramnetina 3-galactósido, quercetina 3- rhamnósido, mirecitina, vitexina y orientina, además en *O. basilaris*, *O. leucotricha* de Candolle, *O. lindheimeri* y *O. quimllo* se encontró quercetina, campferol e isoramnetina, cuyas estructuras química se muestran en la Figura 12.



**Figura 12. Estructura química de algunos flavonoides agliconas típicos en cladodios de *Opuntia*.**

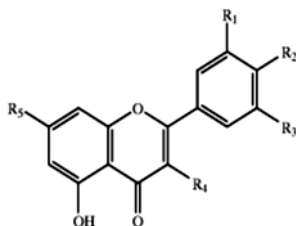
Fuente: Stintzing y Carle, 2005

Los flavonoides presentes en nopal pueden ser clasificados en:

**Flavonoles:** Tienen capacidad para capturar radicales libres y formar complejos con iones metálicos, además tienen una actividad antioxidante muy alta e inhiben la oxidación de la



vitamina C en algunos alimentos; sin embargo, son poco solubles en lípidos. En este grupo se encuentran compuestos como: quercetina, campferol, miricetina, isoramnetina, etc. (Figura 13).



**Figura 13. Estructura general de los flavonoles.**

Flavonol	R1	R2	R3	R4	R5
Isoramnetina	OMe	OH	H	OH	OH
Campferol	H	OH	H	OH	OH
Miricetina	OH	OH	OH	OH	OH
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH
Rutina	OH	OH	H	ORut	OH
Quercetrina	OH	OH	H	ORham	OH

**Flavanonoles:** También son conocidos como dihidroflavonoles y con frecuencia se encuentran asociados con taninos, como ejemplo de este grupo se encuentra el taxifolina, también conocido como dihidroquercetina (Vermerris y Nicholson, 2006).

#### 2.4.4.4 Cuantificación de la capacidad antioxidante

Los antioxidantes se definen como compuestos que por su estructura química son capaces de impedir o prevenir la oxidación de distintas moléculas de importancia biológica, oxidándose ellos en su lugar (Kuskoski y col., 2005).

Pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Gordon, 2001).

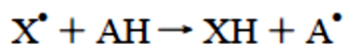
Con frecuencia se utilizan diferentes términos para describir la capacidad antioxidante de los productos. El término “actividad” antioxidante total (o eficiencia, poder, parámetro, potencial,

potencia y actividad), puede indicar la actividad desde el punto de vista químico, lo que puede no tener sentido si no se especifican las condiciones de presión, temperatura, reacción media y punto de referencia, por ello la actividad antioxidante en un ensayo individual refleja solo la reactividad química bajo ciertas condiciones. Por otra parte el término de “capacidad” es independiente de las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción y tiene un significado químico similar, por ejemplo se usa para expresar los resultados obtenidos por diferentes ensayos; tales como, capacidad para atrapar radicales peroxilo, y por consiguiente es más adecuado (Huang y col., 2005).

De manera general, los principales ensayos de capacidad antioxidante se dividen en dos grupos:

### 1) Métodos basados en la Tráansferencia de Átomos de Hidrógeno (HAT).

Estos métodos miden la capacidad de un antioxidante para quelar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente reacción (Prior y col., 2005):



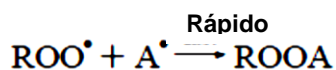
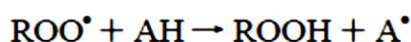
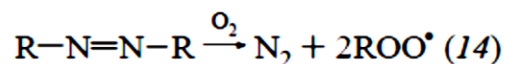
De acuerdo con estos métodos, la medición de la capacidad antioxidante se basa en la cinética de competencia, las reacciones no dependen del pH y son rápidas (segundos o minutos). Sin embargo, tienen como desventaja que la presencia en estas pruebas de agentes reductores, incluyendo metales, hace complejo el ensayo y puede conducir a una alta actividad erróneamente (Prior col., 2005).

Las técnicas para evaluar actividad antioxidante basada en HAT son: a) ORAC (Capacidad para Absorber el Radical Oxígeno), b) TRAP (Parámetro Antioxidante para Atrapar Radicales Totales), c) IOU (Inhibición Rápida de Oxígeno), d) Inhibición de la oxidación del ácido linoleico, e) Inhibición de la oxidación de lípidos de baja densidad (Huang y col., 2005).

#### a) ORAC (Capacidad para Absorber Radicales Oxígeno)

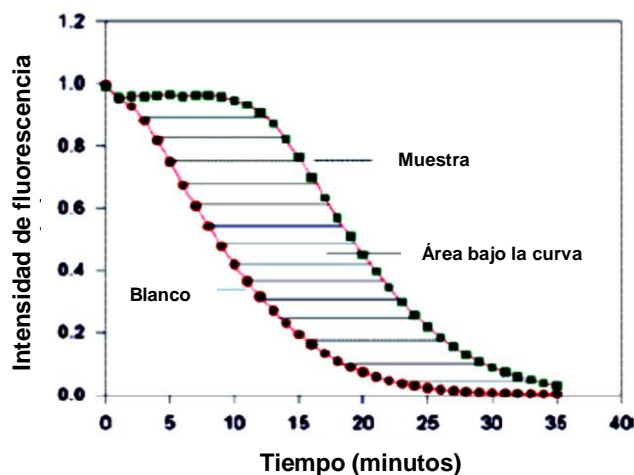
Este método se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno y mide la capacidad de la muestra para inhibir el radical peroxilo (radical libre derivado de nitrógeno). En este ensayo se usa el AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidino) dihidrocloruro) que induce radicales

libres los cuales reaccionan con un sustrato susceptible a la oxidación (lípidos) y en presencia de oxígeno se generan radicales peroxilo (Figura 14). La capacidad antioxidante se cuantifica usando el área bajo la curva generada entre decrecimiento de la fluorescencia en la muestra y el blanco (Trolox), como se muestra en la Figura 15 (Prior y col., 2005).



**Figura 14. Esquema de la reacción entre el AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidino) dihidrocloruro) y un sustrato.**

Fuente: Prior y col., 2005



**Figura 15. Esquema del área bajo la curva formada entre un antioxidante y un control, para la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método ORAC.**

Fuente: Laboratorios Brunswick, 2003; reportada por Prior y col., 2005.

#### **b) TRAP (Parámetro Antioxidante para Atrapar los Radicales Totales)**

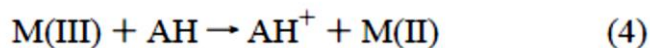
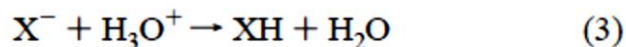
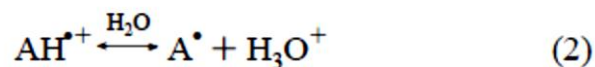
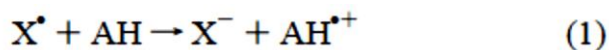
Con este método se monitorea la capacidad de los compuestos antioxidantes para interferir con el radical peroxilo generado por el AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidino) dihidrocloruro). La reacción básica de este ensayo es similar a la de ORAC. Se requiere que

las muestras puedan reaccionar con el radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>) en bajas concentraciones, la oxidación de la muestra es monitoreada ópticamente o por fluorescencia. La capacidad antioxidante puede determinarse por: a) el tiempo que tarda el radical peroxilo en consumir todo el antioxidante, b) el tiempo que tarda la muestra en oxidarse o c) el porcentaje de reducción de una reacción. El valor TRAP se expresa como el tiempo que tarda una muestra en ser oxidada por el radical peroxilo comparado con el tiempo correspondiente para Trolox (Prior y col., 2005).

La desventaja de este método es que fue diseñado y con frecuencia se usa para medir actividad antioxidante *in vivo*, en suero o en plasma, porque mide antioxidantes no enzimáticos como glutatión, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno. Por otra parte, asumir que todos los antioxidantes requieren un tiempo para oxidarse y neutralizar el radical libre y que el cambio en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la actividad antioxidante es un error porque no todos los antioxidantes presentan el mismo comportamiento (Antolovich y col., 2002).

## 2) Métodos basados en la Tráferencia de un solo Electrón (SET).

Se basan en la capacidad que tiene un antioxidante para transferir un electrón que reduzca algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, como se muestra a continuación (Prior y col., 2005):



Los métodos basados en SET son muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, asimismo cuantifican y reducen polifenoles. Su desventaja es que son sensibles a elementos traza, contaminantes y metales (Prior y col., 2005), además, las reacciones involucradas en este grupo son dependientes del pH, usualmente lentas y pueden requerir un largo tiempo

para consumirse, asimismo los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en porcentaje de disminución de los productos más que en cinéticas, lo que provoca una alta variabilidad, pobre reproducibilidad e inconsistencia de los resultados.

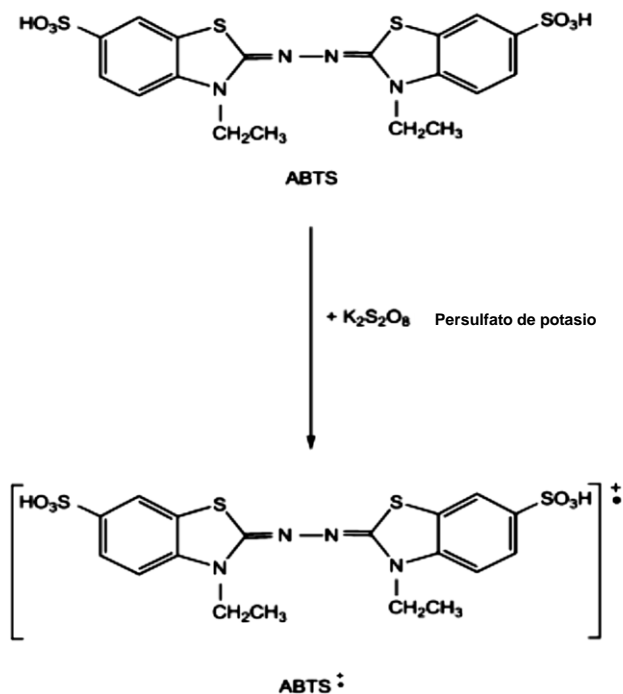
En esta categoría se encuentran las técnicas: a) TEAC (Capacidad Antioxidante equivalente a Trolox), b) DPPH (Difenil-1-Picrilhidrazil), c) FRAP (Parámetro antioxidante del ion Hierro), y d) Fenoles Totales (Huang y col., 2005).

#### **a) TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox).**

En este ensayo se tiene que generar el radical libre de tipo catiónico ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-[3-etil benzotiazolin-6-sulfónico]), esto puede ocurrir tras una reacción de tipo: a) Química (Dióxido de manganeso, persulfato de potasio, etc.) (Figura 16), b) Enzimática (Peroxidasa, mioglobina), o c) Electroquímica (Kyung y col., 2007).

El radical (ABTS<sup>•+</sup>) reacciona activamente con compuestos que donan átomos de hidrógeno, tales como los compuestos fenólicos, carotenoides y algunos antioxidantes del plasma, además es efectivo en un amplio rango de pH; sin embargo es sensible a la temperatura y la luz. La reacción entre la muestra y el radical ABTS<sup>•+</sup> generan una pérdida de color, mostrando su máxima absorbancia a 734 nm y esta actividad es comparada con el Trolox<sup>1</sup> (estándar); los resultados son expresados en términos de Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) (Joon y Takayuki, 2009).

\*1 Trolox es el nombre comercial del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico, que es un derivado de la vitamina E soluble en agua .



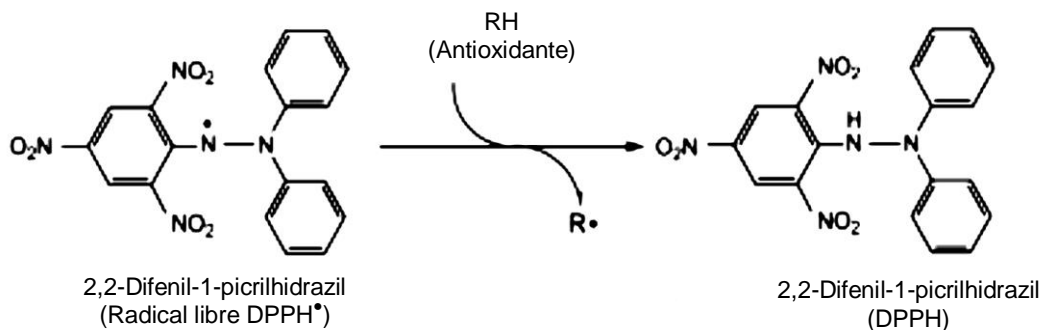
**Figura 16. Formación del radical estable  $ABTS^{\bullet+}$  (ácido 2,2'-[3-etil benzotiazolin-6-sulfónico]), con persulfato de potasio.**

Fuente: Kyung y col., 2007.

#### **b) DPPH $^{\bullet}$ (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil)**

El DPPH $^{\bullet}$  es un radical libre orgánico, derivado de nitrógeno, y no tiene que ser generado antes de usarse, como el radical  $ABTS^{\bullet+}$ . Este método se basa sobre la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical DPPH $^{\bullet}$  (Figura 17).

El ensayo se basa en la medición de la pérdida de color del DPPH $^{\bullet}$  a 515 nm después de haber reaccionado con los compuestos probados. Los resultados se expresan en Trolox o como  $EC_{50}$ , que es la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH $^{\bullet}$  en un 50% (Joon y Takayuki, 2009).



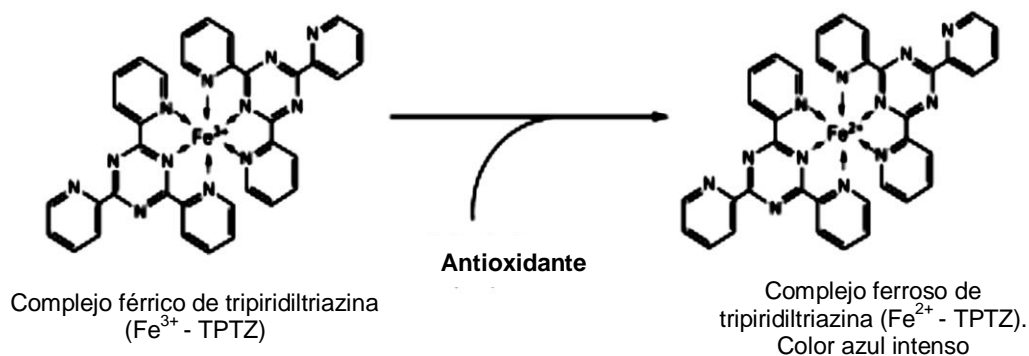
**Figura 17. Reacción entre el radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil) y un antioxidante para formar DPPH.**

Fuente: Joon y Takayuki, 2009.

La desventaja de este método es que no es sensible en la detección del altamente reactivo radical peroxilo, además muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con el radical peroxilo pueden reaccionar lentamente o ser inertes al radical DPPH<sup>•</sup>. Por otra parte, el radical DPPH<sup>•</sup> en solución, pierde color por la presencia de agentes reductores o por compuestos que transfieren átomos de hidrógeno, los cuales contribuyen a resultados imprecisos (Prior y col., 2005).

### c) FRAP (Parámetro Antioxidante del Ion Fierro)

El ensayo es rápido y da resultados reproducibles, este método se fundamenta en la reducción del complejo férrico tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a  $\text{Fe}^{2+}$ , por un antioxidante (Figura 18), bajo condiciones ácidas (pH 3.6), formándose un intenso color azul, la absorbancia máxima de esta reacción ocurre a 593 nm. La desventaja de esta técnica es que determina el potencial para reducir el ion Fe, en lugar de la capacidad antioxidante; además, las muestras a analizar deben ser acuosas, por lo que los antioxidantes de referencia deben ser solubles en agua como el ácido ascórbico, el ácido úrico y el Trolox (Joon y Takayuki, 2009), éste método es un indicador del estado oxido-reducción en la célula o tejidos (Prior y col., 2005).



**Figura 18. Formación del complejo férrico de tripiridiltriazina (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) a partir del complejo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ y un antioxidante.**

Fuente: Prior y col., 2005.

#### d) Fenoles totales

El ensayo para la cuantificación de fenoles Totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu, mide la capacidad de reducción que tiene una muestra; sin embargo esto no se refleja en el nombre de la prueba “fenoles totales”; dicho nombre se ha popularizado debido a que en numerosas investigaciones se ha encontrado una correlación entre el perfil de fenoles totales y la capacidad antioxidante (Huang y col., 2005).

Sin embargo, la prueba de Folin-Ciocalteu, no es específica para compuestos fenólicos, por lo que también reacciona con Vitamina C, Cu (I), carbohidratos, etc. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (que es una mezcla de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico), en condiciones básicas (pH 10), en donde la disociación de un protón fenólico forma un anión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu, originando óxidos azules de wolframio (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) y molibdeno (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>), esta coloración es independiente de la estructura del compuesto fenólico (Huang y col., 2005). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 750 nm. Previamente se prepara una curva estándar de ácido gálico, para interpolar los resultados, estos se expresan en mg de ácido gálico por gramo de tejido.

## 2.5 Oscurecimiento enzimático en productos vegetales

El oscurecimiento es el factor más importante que limita la comercialización de los productos mínimamente procesados y reduce considerablemente la vida de anaquel de estos. Los



cambios en color pueden presentarse como un oscurecimiento, encafecimiento o pardeamiento, como consecuencia de reacciones enzimáticas asociadas con la acción de las enzimas polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POD) o fenilalanina amonioliasa (PAL), que están involucradas en la oxidación de compuestos fenólicos (Badui, 2006; Balois-Morales y col., 2008).

### **2.5.1 Polifenol oxidasa (PPO; E.C.1.10.3.1)**

Esta enzima se descubrió en 1856 por Schoenbein y está involucrada con el oscurecimiento de alimentos de origen vegetal que han sufrido daños físicos y que exponen su tejido al aire, la razón por la que no ocurre este cambio en células intactas indica que existe un microambiente anaeróbico dentro del fruto que impide que ocurra el proceso y además la enzima y el sustrato se encuentran en compartimientos celulares separados impidiendo que ocurran las reacciones (Badui, 2006).

La polifenoloxidasa recibe los nombres de: tirosinasa, fenolasa, monofenol oxidasa, catecol oxidasa, catecolasa, o-difenol oxidasa, y cresolasa. Presentan dos tipos de actividad catalítica: 1) actividad de fenol hidroxilasa o cresolasa, que hidroxila normalmente los sustratos en posición orto y produce fenoles ortohidroxilados o difenoles (actividad monooxigenasa, EC 1.14.18.1) y 2) actividad de polifenoloxidasa o catecolasa, que efectúa una oxidación de los difenoles previamente formados y los convierte en ortoquinonas (actividad de catecolasa, E.C.1.10.3.1). No todas las polifenol oxidasas catalizan la primera reacción, pero todas catalizan la segunda reacción. El producto de la segunda reacción es una benzoquinina que se polimeriza inmediatamente formando compuestos coloridos (Whitaker y col., 2003; Arias y col., 2007; Damodaran y col., 2010).

Los sustratos más comunes de esta enzima son los compuestos insaturados, principalmente lo que tienen estructura de monofenoles o de o-difenoles, entre los que destaca la tirosina de papa, los flavonoides, los taninos, las antocianinas, el ácido clorógeno, 3,4 dihidroxifenilalanina, la dopamina, el p-cresol, la adrenalina, la catequina o catecol, etc.

La acción enzimática no forma directamente los pigmentos pardos, lo hacen las o-quinonas que derivan de la acción de la enzima las que sufren reacciones de condensación química (que pueden implicar aminas y proteínas) para dar lugar a diversos productos poliméricos y conjugados llamados melaninas.

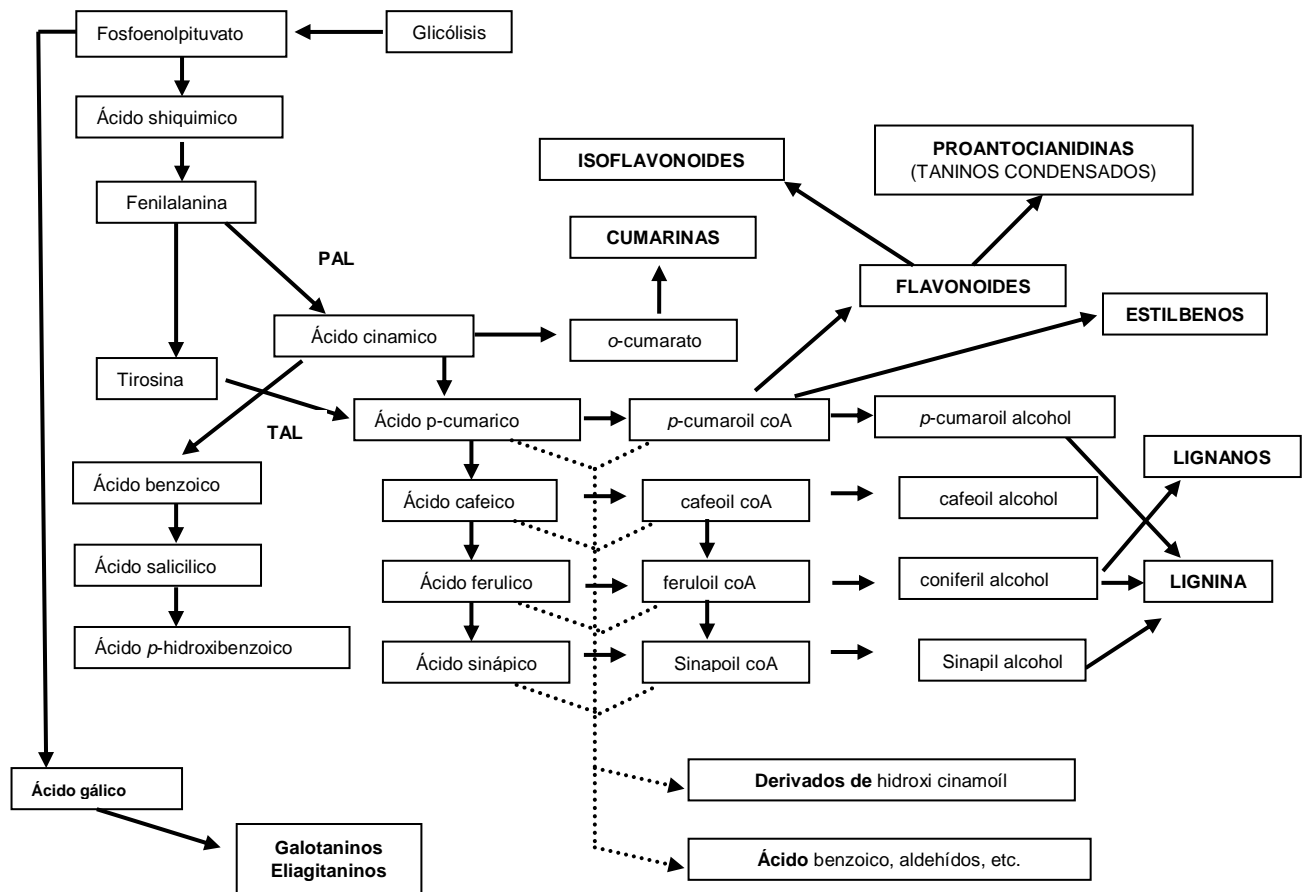
### **2.5.2 Peroxidasa (POD; EC. 1.11.1.7)**

Las peroxidases son hemoproteínas glicosiladas y monoméricas, con una masa de 40-45 kDa. La enzima utiliza  $H_2O_2$  o algunos peróxidos orgánicos como aceptores de hidrógeno para catalizar la oxidación de una variedad de donadores de hidrógeno como fenoles, aminas aromáticas, entre otros (Whitaker y col., 2003). Los papeles fisiológicos de esta enzima incluyen la formación y degradación de lignina, la oxidación del regulador vegetal indol ácido acético (involucrado en los procesos de maduración y senescencia), cataliza la oxidación de sustratos fenólicos en presencia de peróxido de hidrogeno, proporciona una defensa frente a parásitos y patógenos, y elimina el exceso de  $H_2O_2$  celular. Las isoformas de esta enzima se clasifican de acuerdo a su punto isoeléctrico, en ácidas, neutras o alcalinas, siendo la peroxidasa neutra de la raíz de rábano, la más estudiada (Pourcel y col., 2006; Damodaran y col., 2010).

### **2.5.3 Fenilalanina amonio liasa (PAL; E.C.4.3.1.5)**

En las plantas la biosíntesis de los compuestos fenólicos es iniciada por la ruta del ácido shiquímico. Esta ruta continúa con la producción de fenilalanina, la cual es desaminada por la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). La PAL puede desaminar tanto a la L-fenilalanina como a la L-tirosina para producir ácido cinámico y p-cumárico respectivamente, catalizando la primera fase de la ruta de los fenilpropanoides, así mismo el ácido cinámico es también modificado por la acción de hidroxilasas y o-metiltransferasas. El amoníaco liberado se vuelve a fijar por la glutamina sintetasa para producir glutamina. (Douglas, 1996). En la Figura 19, se muestran los productos terminales de la ruta del ácido shiquímico tales como: la lignina, los lignanos, los estilbenos y los compuestos fenólicos. LA PAL participa en 5 rutas metabólicas: a) el metabolismo de la tirosina, b) el metabolismo de la fenilalanina, c) el metabolismo del nitrógeno, d) la biosíntesis de fenilpropanoides y e) biosíntesis de alcaloides. La actividad de PAL se induce dramáticamente en respuesta a diversos estímulos

tales como el daño tisular, ataque de patógenos, luz, bajas temperaturas (Salveit, 2000).



**Figura 19. Biosíntesis de diferentes compuestos fenólicos a través de la ruta del ácido shiquímico. PAL: Fenilalanina amonio liasa.**

Fuente: Dicko y col., 2006.

## 2.6 Tecnologías de conservación postcosecha de los productos vegetales

Entre las técnicas de conservación más usadas en los productos hortofrutícolas y entre ellos el nopal, se encuentran el almacenamiento en atmósferas modificadas y la refrigeración.

### a) Refrigeración

Las bajas temperaturas conservan la calidad postcosecha de los productos hortofrutícolas debido a que retardan diversos procesos, tales como: a) los cambios causados por la madurez de los productos (color y firmeza), b) los procesos metabólicos (respiración, producción de etileno, actividad enzimática), c) la pérdida de humedad por transpiración y

d) la invasión y desarrollo de hongos, bacterias y levaduras, entre otros (Wiley, 1997; Wills y col., 1998).

Con relación a la conservación por refrigeración, cabe mencionar que la tolerancia al frío es diferente en cada uno de los productos hortofrutícolas, de manera que algunos pueden ser almacenados a temperaturas por debajo del punto de congelación, mientras que otros se dañan a temperaturas bajas por encima del punto de congelación y deben ser almacenados a temperaturas incluso mayores a los 10-13 °C. La intensidad del daño por frío está en función del tiempo de exposición, especie vegetal, estado de madurez o desarrollo, variedad, etc. En ocasiones el daño inducido por baja temperatura puede ser revertido si el tejido regresa a condiciones de temperatura ambiente, antes de que el daño sea irreversible (Hodges y col., 1997).

En el caso del nopal, se ha reportado que mediante un almacenamiento a temperaturas de 5 y 10 °C, se retrasa la disminución en el contenido de ácido ascórbico, al igual que otros compuestos como los flavonoides (quercetina, miricetina, campferol y isoramnetina (Lee y col., 2000).

#### **b) Atmósferas Modificadas**

La tecnología de conservación en atmósfera modificada (AM) consiste en envasar los productos alimenticios en recipientes cubiertos con materiales plásticos que presentan una barrera selectiva a la difusión de los gases, de tal forma que la composición del aire (78.08 % N<sub>2</sub>, 20.96 % O<sub>2</sub>, 0.03 % CO<sub>2</sub> y trazas de gases inertes) se ve modificada para disminuir la tasa de respiración, el crecimiento microbiano y retrasar el deterioro debido a la acción enzimática, con el propósito de alargar la vida útil del producto (Ospina y Cartagena, 2008). Usualmente involucra una reducción en los niveles de oxígeno y/o una elevación de los niveles de CO<sub>2</sub> (González-Aguilar y col., 2005).

La preservación de alimentos por medio de la modificación de la atmósfera que los rodea ha demostrado ser una buena alternativa como complemento a la refrigeración. Existen dos modalidades de envasado en atmósferas modificadas.

### Atmósfera Pasiva

Implica la colocación de los productos en un envase permeable a los gases, cerrado del envase y que la propia respiración de los productos origine una reducción de la concentración de O<sub>2</sub> y aumento del CO<sub>2</sub> dentro del envase hasta que se alcance un estado de equilibrio adecuado (Smith y col., 1990). Con relación a este tipo de envasado, Guevara y col., (2001) reportaron que los cladodios de *Opuntia ficus-indica*, variedad 'Milpa Alta', almacenados en una atmósfera modificada pasiva (8.6 % O<sub>2</sub> y 6.9 % de CO<sub>2</sub>), prolongó la vida de almacenamiento y mantuvo la calidad por 30 días a 5 °C, disminuyendo la pérdida de peso y manteniendo la firmeza y el color.

### Atmósfera Activa

Implica la colocación de los productos en un envase permeable a los gases, sustitución o desplazamiento de gas del envase o el uso de absorbentes, para establecer una mezcla deseada de gases con O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, seguido por un cierre rápido del envase. Algunos ejemplos de atmósfera modificada activa se describen a continuación (Smith y col., 1990; Farber y col., 2003):

- **Invasado al vacío.** En este sistema el producto es colocado en envases en donde el aire se extrae totalmente y posteriormente se procede a su sellado. El almacenamiento al vacío retrasa la maduración de las frutas, de manera proporcional a la reducción del oxígeno y en algunos casos a la del etileno. Una reducción de la presión del aire de 10 kPa (0.1 atm) equivale a una reducción en la cantidad de oxígeno disponible (a un nivel del 2%) en la atmósfera que está en contacto con el producto y debido a que la cantidad de O<sub>2</sub> que queda en el producto es reducida, éste se consume en un corto tiempo, quedando una atmósfera de CO<sub>2</sub>, con la cual se puede prevenir el oscurecimiento enzimático pero se pueden producir condiciones de anaerobiosis y con ello el desarrollo de metabolitos fermentativos (Wills y col., 1998).

- **Invasado con bajos y altos niveles de oxígeno.** Los bajos niveles de oxígeno o las condiciones hipobáricas, pueden tener varios efectos en el producto, tales como estimular, retardar o no mostrar cambios en la tasa de respiración y producción de etileno; esto dependerá del producto, estado de madurez, tiempo de almacenamiento, concentración de oxígeno, temperatura y la concentración de otros gases como el CO<sub>2</sub> y el etileno (Del Valle y

Palma, 2007). Con relación a los bajos niveles de O<sub>2</sub>, se ha reportado que disminuyen la actividad de enzimas relacionadas con el ablandamiento y se reduce la producción de etileno; sin embargo, en estas condiciones se producen olores y sabores desagradables en el producto, como consecuencia de las condiciones anaeróbicas; mientras que los altos niveles de oxígeno favorecen la liberación de radicales libres, los cuales pueden inducir daños en los tejidos (Del Valle y Palma, 2007).

●**Envasado con altos niveles de CO<sub>2</sub>.** El dióxido de carbono inhibe el crecimiento de bacterias y virus o puede intervenir retardando la síntesis de toxinas de estos microorganismos (Bidawid y col., 2001). No obstante, su actividad depende de la concentración del gas, la temperatura de incubación, el grado de madurez o desarrollo del producto y la a<sub>w</sub> del medio. Existen varias teorías sobre su efecto en el metabolismo del producto y los microorganismos: a) tienen un efecto antimicrobiano, causando una alteración en la membrana celular e interfiriendo con el consumo y absorción de nutrientes, b) reduce el pH en la superficie del producto por efecto del ácido carbónico que forma el CO<sub>2</sub> disuelto en el agua libre del producto, retardando el crecimiento microbiano (Wiley, 1997) y c) provoca una disminución en la actividad fotorespiratoria del producto (Gómez-Casanovas y col., 2007).

Guevara y col., (2003), reportaron que en cladodios de nopal almacenados a 5 °C por 35 días bajo atmósferas activas con una concentración entre 7-20 kPa de CO<sub>2</sub>, se observa una disminución en la firmeza y contenido de fibra, asimismo, se reduce la actividad de clorofilasas y la carga microbiana. Por otra parte, niveles de CO<sub>2</sub> ≥ 40 kPa causan daño en los cladodios, comparados con los nopales que se almacenaron sin empaque.

●**Envasado con gases nobles.** Entre los gases inertes de mayor interés para la conservación postcosecha de productos hortofrutícolas se encuentran el argón (Ar), el helio (He), el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y el nitrógeno (N<sub>2</sub>). Se ha reportado que el Ar, suprime el crecimiento de ciertos microorganismos, reduce la actividad enzimática y controla reacciones químicas deteriorativas en productos perecederos. El N<sub>2</sub>O, retarda la síntesis y acción de etileno (González- Aguilar col., 2005). Mientras que el N<sub>2</sub> disminuye la respiración de los organismos y retarda los procesos de oscurecimiento en productos como haba, lechuga y rebanadas de manzana almacenados en atmósfera modificada, esta acción puede deberse a

que el O<sub>2</sub> atmosférico es sustituido por nitrógeno el cual no participa en el metabolismo de los organismos aerobios y además no puede atravesar la membrana celular por su baja solubilidad en agua (Soliva-Fortuny y col., 2001; Madrid y col., 2003; Nasar-Abbas y col., 2008). Siendo las AM con N<sub>2</sub> una tecnología postcosecha con un amplio potencial para la conservación de productos hortofrutícolas susceptibles al oscurecimiento, entre ellos los mínimamente procesados.

### III. HIPÓTESIS

El nopal mínimamente procesado envasado en atmósferas modificadas con nitrógeno y pasiva, incrementará sus sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, fortaleciendo su capacidad antioxidante y retardando la síntesis de compuestos fenólicos.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 General

Identificar y cuantificar los compuestos antioxidantes, la capacidad antioxidante y la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos, de dos variedades de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) almacenadas en atmósferas modificadas.

#### 4.2 Particulares

1. Cuantificar el contenido de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro de los envases
2. Cuantificar la actividad específica de las enzimas antioxidantes: SOD, APX y CAT.
3. Determinar el contenido de los compuestos antioxidantes no enzimáticos: fenoles y carotenoides totales.
4. Cuantificar la capacidad antioxidante del nopal (ABTS<sup>±</sup>).
5. Evaluar la actividad específica de las enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos: PPO y PAL.
6. Identificar y cuantificar el contenido de flavonoides en nopal.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Manejo del experimento

Los cladodios se cosecharon por la mañana (6-7 am) y se transportaron en rejas de plástico al laboratorio e inmediatamente se seleccionaron por uniformidad en color, tamaño (20-25 cm) y ausencia de defectos de acuerdo con la norma del Codex alimentarius (CODEX STAN 185, 1993). Posteriormente se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm durante 3 minutos, se retiró el exceso de agua de forma natural (escurriendo el nopal por 5 minutos), se desespinaron y reborderaron manualmente.

La unidad experimental estuvo formada por 4 cladodios envasados en bolsas Polysweat (Bolco®) con tres réplicas; la aplicación de la atmósfera con N<sub>2</sub> al 100% se realizó mediante un vacío parcial, posterior inyección del gas y sellado del empaque utilizando una máquina empacadora Multivac C100 (Wolfertschwenden, Alemania); la atmósfera pasiva consistió en la mezcla de aire atrapado durante el sellado de la bolsa Polysweat (Bolco®) y el testigo consistió en NMP colocado en charolas abiertas de poliuretano. Posteriormente las muestras de cada uno de los tratamientos aplicados, se almacenaron a 4±1 °C y 95% HR durante 20 días. De cada cultivar de nopal se utilizaron 3 lotes de 84 cladodios para aplicar los tratamientos antes descritos (T1= atmósfera modificada con N<sub>2</sub>, T2= atmósfera pasiva y T3= el testigo).

### 5.2 Material de empaque

Las especificaciones técnicas de la bolsa Polysweat (Bolco®) son: película monocapa de polietileno de 34 cm de longitud, 26.5 cm de ancho y 35 micras de espesor, con permeabilidad selectiva al oxígeno, acetileno, bióxido de carbono y vapor de agua (260.6 g O<sub>2</sub>·10 in<sup>2</sup>·24 h·37.8 °C y 0 %H.R; 6.58 g H<sub>2</sub>O·100 in<sup>2</sup>·24 h a una atmósfera, 23 °C y 90 % H.R).



### 5.3 Manejo de la muestra

Para la determinación de las variables: a) Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), polifenol oxidasa (PPO) y fenilalanina amonio liasa (PAL), b) fenoles totales, c) carotenoides totales y d) flavonoides. Se colectaron 200 g de nopal, en los días 0, 1, 3, 5, 10, 15 y 20 del almacenamiento. Las muestras recuperadas se maceraron con nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su análisis.

Para cuantificar la capacidad antioxidante, se realizó una extracción diferencial con solventes de distinta polaridad (acetona y metanol). La extracción consistió en mezclar 150 g de nopal (previamente licuado) y 250 mL de acetona, esta mezcla se colocó en un baño ultrasónico (Branson<sup>®</sup>) durante una hora y posteriormente se filtró (primera extracción). La muestra sólida que se recuperó se colocó en 250 mL de metanol y se repitió el procedimiento antes descrito (segunda extracción). Las soluciones obtenidas en ambas extracciones se evaporaron por separado utilizando un rotavapor (IKA Modelo RV 05 básico, Alemania) y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### 5.4 Contenido de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro del envase

Para la cuantificación de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro de los envases, se utilizó el método propuesto Ishikawa y col., 1997, que consistió en tomar 1 mL de la atmósfera del espacio cabeza de los envases y posteriormente se inyectó en un cromatógrafo de gases Gow-Mac serie 580 equipado con una columna CTR1 de 1.83 m de longitud y 1/4" de diámetro interno (Alltech, Grace Vydac Co., Columbia, MD, USA) y se utilizó Helio como gas acarreador con un flujo de 65 mL·min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de la columna, el inyector y el detector de conductividad térmica fueron de 40, 50 y 115 °C, respectivamente. El tiempo de retención del CO<sub>2</sub> fue de 0.823 min y de 1.987 min para el O<sub>2</sub>.

### 5.5 Variables fisiológicas

#### 5.5.1 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1)

Se utilizaron 0.5 g de tejido de nopal que se maceraron con 5 mL de buffer de extracción

[bifosfato de potasio 100 mM ( $K_2HPO_4$ , Baker USA.)], ascorbato de sodio 10 mM (Sigma, USA) y ácido dietilentriaminopentaacético 5 mM (DTPA, Baker USA.), pH 7.0 y 30 mg de polivinilpolipirrolidona insoluble (Sigma, USA)]. El homogeneizado se centrifugó a 16000 g en una centrifuga Beckman GS-15R (Beckman Coulter, Inc<sup>®</sup>) durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía a la enzima SOD se desaló previo al ensayo utilizando filtros AMICON de Millipore<sup>®</sup> fabricados con un copolímero (estireno-butadieno) y una membrana de celulosa regenerada de baja capacidad de unión, de 29.6 mm de diámetro

La actividad de la SOD se determinó por el método modificado de nitrilo azul de tetrazolio (NBT Sigma USA) de acuerdo con Beyer y Fridovich (1987). El volumen total de la reacción (1mL) contenía 2.5  $\mu$ L de muestra, 0.025% de Triton X-100 y 57  $\mu$ mol de NBT. Para ajustar el volumen de la mezcla de reacción se adicionó buffer de reacción que contenía  $K_2HPO_4$  0.05 M y DTPA 200 $\mu$ M. La reacción se inició añadiendo metionina 0.01 M (Sigma USA) y riboflavina 1.13  $\mu$ M (Sigma, USA) (sistema fotogenerador del radical anión superóxido) y se colocó el tubo de reacción en presencia de luz fluorescente (30-W) durante 30 min. El desarrollo de la coloración púrpura se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 uv- vis (Beckman Coulter, Inc<sup>®</sup>) utilizando como blanco el buffer del ensayo. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que causa un 50% de inhibición en la reducción del NBT y los valores de actividad se reportan en UI  $mg^{-1}$  proteína.

### **5.5.2 Actividad de la enzima catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6)**

Para la extracción de CAT se utilizaron 0.5 g de tejido de nopal que se maceraron con 5 mL de buffer de extracción conteniendo  $KH_2PO_4$  3mM y  $Na_2HPO_4$  50 mM (Baker, USA), pH 7. El homogeneizado se centrifugó a 16000 g durante 45 minutos a 4 °C, utilizando una centrifuga Beckman GS-15R (Beckman Coulter, Inc<sup>®</sup>). Se desechó la pastilla y el sobrenadante se utilizó como fuente enzimática. La actividad de CAT se determinó de acuerdo al método descrito por Aebi (1984) en donde la mezcla de reacción contenía 0.5 mL de  $H_2O_2$  5 mM y 1 mL de extracto enzimático diluido 1:10 con el buffer de extracción (v/v). La actividad de CAT se determinó midiendo los cambios de la absorbancia a 240 nm en intervalos de 5 segundos durante los primeros 15 segundos. Una unidad de CAT se definió como la cantidad de enzima necesaria que descompone 1  $\mu$ M  $H_2O_2$   $min^{-1}$  a 25 °C. El coeficiente de extinción

molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm fue de 40 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los valores de actividad de CAT se reportan como UI mg<sup>-1</sup> proteína.

$$\text{Peróxido de hidrógeno oxidado por CAT } (\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso fresco} \cdot \text{minuto}^{-1}) \\ = \frac{(\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}})(\text{Volumen de extracción})}{(\text{Coeficiente de extinción})(\text{Volumen de muestra en a reacción})(\text{peso muestra})}$$

### 5.5.3 Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX; E.C. 1.11.1.11)

Para la extracción de APX se maceraron 0.5 g de tejido de nopal con 5 mL de buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7 (Sigma USA) conteniendo ascorbato de sodio 1 mM, EDTA 0.1 mM (Baker, USA) y 1 % polivinilpolipirrolidona (PVPP). El homogeneizado se centrifugó a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó como fuente enzimática. La actividad de APX se determinó de acuerdo con el método de Nakano y Asada (1981) empleando una dilución del sobrenadante 1:2. La mezcla de reacción contenía 1 mL de muestra, 1mL de buffer de actividad (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ascorbato de sodio 0.5 mM, pH 7) y 40 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM. Los cambios en la absorbancia se midieron a 290 nm. Una unidad de APX se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μM de ascorbato min<sup>-1</sup> a 25 °C, el coeficiente de extinción molar del ascorbato a 290 nm fue de 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los valores de la actividad de APX se reportaron como UI mg<sup>-1</sup> proteína.

$$\text{Ascorbato oxidado por APX } (\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso fresco} \cdot \text{minuto}^{-1}) \\ = \frac{(\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}})(\text{Volumen de extracción})}{(\text{Coeficiente de extinción})(\text{Volumen de muestra en a reacción})(\text{peso muestra})}$$

### 5.5.4 Actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO; E.C.1.10.3.1)

Para la extracción y cuantificación de la enzima PPO se utilizó el método descrito por Flurkey y Joseph (1978), el cual consistió en mezclar 1.5 g de nopal con 5 mL de buffer de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M (pH 6.2), que contenía 1% de PVPP. El homogenado se centrifugó a 16,000 g X 30 minutos a 4 °C. Se utilizó el sobrenadante como fuente inicial de la enzima. La actividad de la PPO se cuantificó evaluando los cambios en la absorbancia a 420nm, en la mezcla de

reacción que contenía 1300  $\mu\text{L}$  de buffer  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50mM pH 6.2, 200  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 1000  $\mu\text{L}$  de catecol 0.2M. Los valores de la actividad de PPO se reportaron como  $\text{UI mg}^{-1}$  proteína, una unidad de PPO se define como la cantidad de enzima que causa un incremento de 0.1 unidades de absorbancia.

#### **5.5.5 Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL; E.C.4.3.1.5)**

La extracción de la enzima PAL en tejido de nopal, se realizó a partir de 0.8 g de muestra que se homogeneizaron con 8 mL de buffer de borato 0.1 M (pH 8), que contenía  $\beta$ -Mercaptoetanol 5 mM, EDTA 2mM y 1 % de PVPP. El homogenado se centrifugó a 12 000 g X 40 minutos a 4 °C y el sobrenadante se utilizó como fuente enzimática. Para cuantificar la actividad de la enzima PAL se incubó por 1 hora a 37 °C la mezcla que contenía 0.1 mL de sobrenadante y 2.9 mL de buffer de actividad pH a 8, formado por borato de sodio 0.1 M y fenilalanina 3 mM. Los cambios en absorbancia se midieron a 290 nm. Una unidad de PAL se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbancia de 0.01, en 1 hora a 37 °C. Los valores de la actividad de PAL se reportaron como  $\text{UI mg}^{-1}$  proteína (Jiang and Fu 1999; Jiang y Joyce, 2003).

#### **5.5.6 Determinación de proteína**

La concentración de proteína fue determinada en cada uno de los extractos enzimáticos, de acuerdo con el método de Lowry y col., (1951). Las evaluaciones se hicieron utilizando un kit de Bio-Rad (Hércules, California) que contenía dos reactivos A y B, lo cuales se utilizaron en la mezcla de reacción. La cuantificación de proteína consistió en colocar 800  $\mu\text{L}$  del reactivo A (tartrato de cobre alcalino, Kit de Bio-Rad), 100  $\mu\text{L}$  del reactivo B (Folin diluido, Kit de Bio-Rad) y 200  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático (dilución 1:20), la mezcla se dejó reposar por 15 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm. Se utilizó una curva estándar de albumina bovina (Sigma, USA) para expresar los resultados.

## 5.6 Variables bioquímicas

### 5.6.1 Fenoles totales

Los fenoles totales se cuantificaron usando el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Se utilizaron 0.5 g de nopal que se mezclaron con 5 mL de una solución acuosa de metanol al 80% y se centrifugó a 6500 rpm durante 30 minutos con una centrífuga Beckman GS-15R(Beckman Coulter, Inc<sup>®</sup>). La mezcla de reacción se formó con 20  $\mu$ L del sobrenadante, 250  $\mu$ L de reactivo de Folin Ciocalteu, 750  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ajustando a un volumen final de 5 mL con agua desionizada. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente previo a la lectura de la absorbancia a 760 nm (Biomate-3<sup>®</sup>, USA). El contenido de fenoles totales se reportó como equivalentes de ácido gálico (EAG) en  $\mu$ g por gramo de peso fresco.

### 5.6.2 Carotenoides totales

Para la extracción de carotenoides se utilizaron 2 g de tejido de nopal y se maceraron con 10 mL de hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v). El homogeneizado se centrifugó a 6500 rpm durante 30 minutos, utilizando una centrífuga Beckman GS-15R (Beckman Coulter, Inc<sup>®</sup>), recuperándose la fase hexánica y aforándose a 10 mL con hexano. Los carotenoides se determinaron por el método reportado por Rodríguez-Amaya (1999), midiendo la absorbancia de la fase hexánica a 450 nm utilizando un espectrofotómetro Biomate-3<sup>®</sup> (USA) el coeficiente de extinción molar del  $\beta$ -caroteno a 450 nm fue de 2505 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los resultados se reportaron como  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno por gramo de peso fresco, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Carotenoides totales} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \text{ peso fresco} \right) \\ = \frac{(A_{450 \text{ nm}}) (\text{volumen de aforo})(10^6)}{(\text{Coeficiente de extinción molar})(\text{peso muestra})(100)} \end{aligned}$$

### 5.6.3 Flavonoides

Para la extracción de flavonoides se utilizó la metodología propuesta por Mustafa y col., (2010), que consistió en mezclar 5 g de tejido con 20 mL de metanol al 60 % y 5 mL de HCl 6M. La mezcla se mantuvo a 65 °C durante 2 horas, posteriormente se filtró utilizando membranas de nylon de 0.20 µm (Nalgen®).

Para el análisis cromatográfico se utilizó un HPLC (Waters® Serie 2996), compuesto de un sistema de bombas cuaternarias, un detector de arreglo de diodos, inyector manual y degasificador. Para la separación de analitos se utilizó una columna Eclipse XDB de fase reversa (C<sub>18</sub>) de 50 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 3.5 µm. La fase móvil se compone de dos soluciones: 1) Solución A: compuesta por una mezcla de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (95.5:0.5) y 2) solución B: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (Acetonitrilo). El gradiente de elución utilizado fue: a los 0-2 min, 30-80% de B; al minuto 3, 40% de B; en el minuto 5, 30% de B y en el minuto 7, 20% de B. La temperatura de la columna se mantuvo a 23 °C, la velocidad del flujo fue de 0.8 mL·min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección fue de 20 µL. Las longitudes de onda utilizadas para las evaluaciones fueron de 200-400 nm.

### 5.6.4 Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) utilizando el radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2.-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

Las evaluaciones se hicieron de acuerdo al método descrito por Kuskoski (2005), que consistió en generar el radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2.-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, sal diamónica), a partir de ABTS (7mM) y persulfato de potasio (2.45 mM), la mezcla se incubó en oscuridad durante 12-16 h a temperatura ambiente (20 °C). Una vez formado el radical se ajustó a 0.7 la absorbancia de la solución a 754 nm. El ensayo consistió en colocar 1 mL radical ABTS<sup>•+</sup> y 10 µL de extracto de nopal. Después de 6 minutos se evaluó el cambio en la absorbancia. Los resultados se expresaron como equivalentes a Trolox, utilizando la curva estándar de este compuesto.

## 5.7 Análisis estadístico de los resultados

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3 y la comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Se utilizó el paquete computacional SAS (Statistical Analysis Software, 1989) para el análisis de datos.

El modelo estadístico utilizado fue:  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i \beta_j + \epsilon_{ij}$

i: Factor A (efecto de la variedad) con dos niveles: 'Milpa Alta' y 'Atlixco'

j: Factor B (efecto de la atmósfera) con tres niveles: Nitrógeno, Atmósfera pasiva (AP) y testigo (sin película plástica).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Contenido de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> dentro del envase

En la Figura 20 se presentan los cambios en el contenido de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del espacio de cabeza de los nopales envasados en atmósfera modificada con nitrógeno y atmósfera pasiva. Independientemente del cultivar, se observó un comportamiento diferente en el contenido de estos gases por efecto de la atmósfera. En AN<sub>2</sub> los niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> incrementaron continuamente durante el almacenamiento, mientras que en AP se observó el comportamiento típico reportado por diversos autores, que consiste en un incremento en los niveles de CO<sub>2</sub> y una disminución en los niveles de O<sub>2</sub> (Lee y col., 1995; Ares y col., 2007). No hubieron diferencias ( $P < 0.05$ ) en los niveles de O<sub>2</sub> (4%) y de CO<sub>2</sub> (3-3.8%) alcanzada por ambos cultivares almacenados bajo AN<sub>2</sub>, y estos estaban en el rango recomendado para vegetales de acuerdo con Cantwell y Suslow (2002). Sin embargo, los resultados en AP indicaron que este tratamiento redujo significativamente la concentración de O<sub>2</sub> en el cultivar 'Milpa Alta' en comparación con 'Atlixco'.

El comportamiento observado en AP es resultado de la respiración del producto, consumiéndose el O<sub>2</sub> y liberándose el CO<sub>2</sub>, ambos gases se acumulan dentro del envase debido a las características de la película plástica. Mientras que en la AN<sub>2</sub>, el incremento en los niveles de O<sub>2</sub>, podría deberse a las características de permeabilidad del envase al nitrógeno (datos no proporcionados por el proveedor), permitiendo la salida del nitrógeno y la entrada de O<sub>2</sub> (por ser el segundo gas más abundante en la atmósfera) para llegar a un equilibrio en la atmósfera interna.

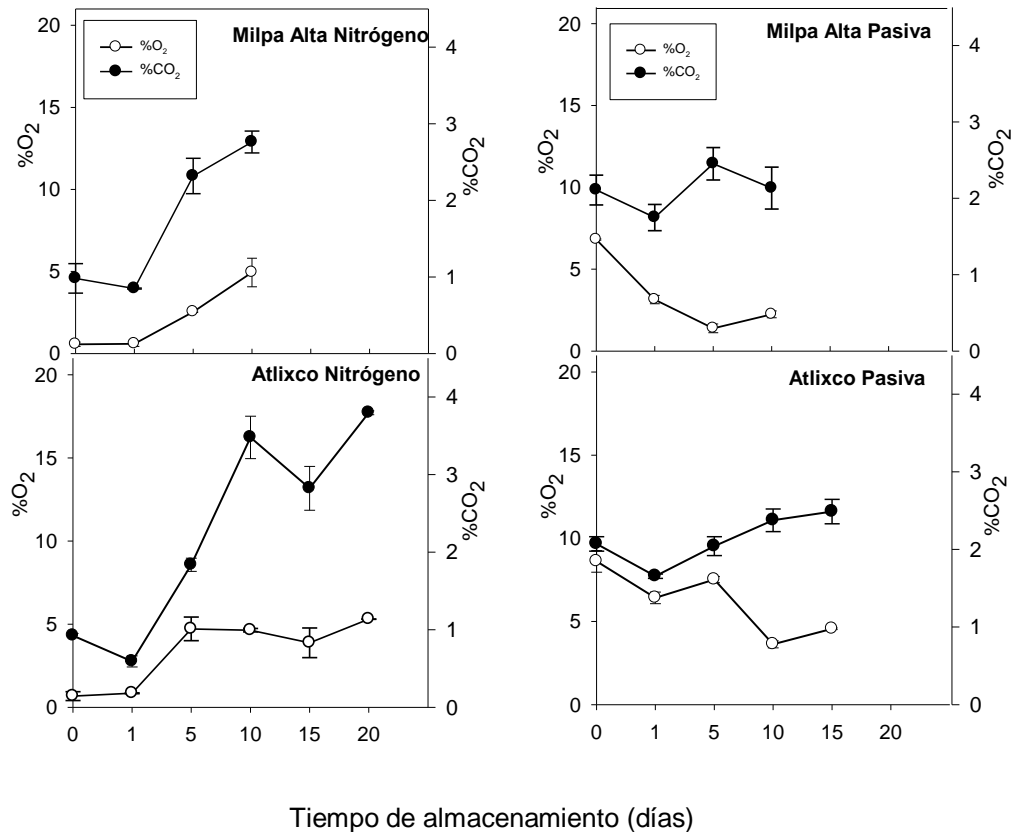


Figura 20. Concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza de los cultivares de nopal 'Atlixco' y 'Milpa Alta', envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. (—○—) % O<sub>2</sub> y (—●—) % CO<sub>2</sub>. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

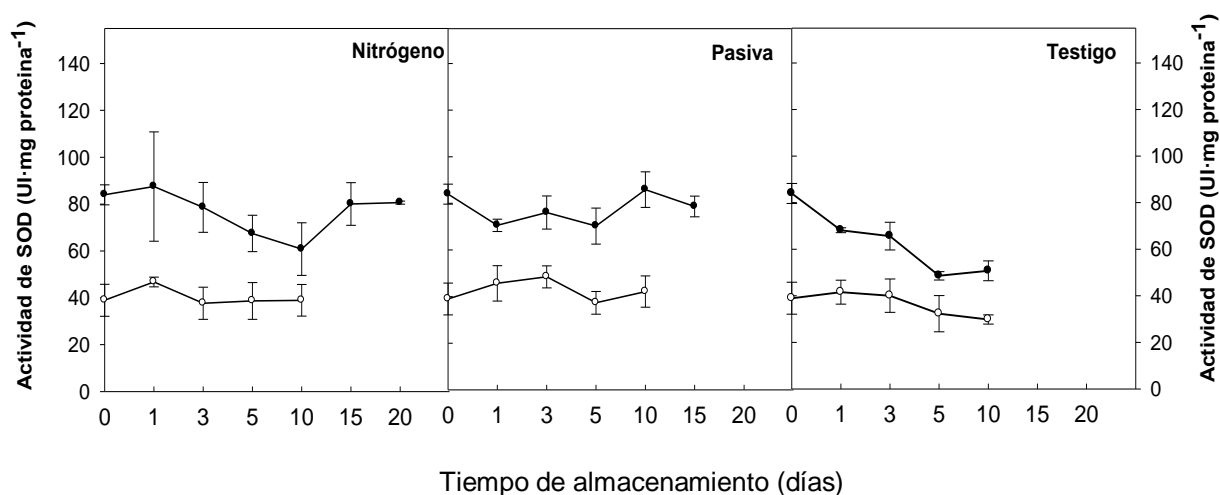
## 6.2 Efecto de las atmósferas modificadas en la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa

En general, se encontró que la actividad de SOD, APX y CAT estuvo determinada tanto por el cultivar de nopal como por la atmósfera modificada aplicada. El cultivar 'Atlixco', presentó la mayor actividad enzimática independientemente de los tratamientos, con respecto al cultivar 'Milpa Alta'. En el cultivar 'Atlixco' (Figura 21) las atmósferas modificadas estudiadas mantuvieron sin cambios significativos la actividad de la SOD (75-85 UI mg proteína<sup>-1</sup>) durante el almacenamiento ( $P \leq 0.05$ ), mientras que en los nopales del grupo testigo se presentó una disminución gradual alcanzando una actividad de 50 UI mg proteína<sup>-1</sup> a los 10 días del almacenamiento. Este comportamiento podría deberse a que esta enzima es dependiente de oxígeno y en las atmósferas modificadas se ve reducida considerablemente



la concentración de este gas. No obstante, en los nopales del grupo testigo, la disminución observada en la actividad de SOD, podría atribuirse a que estos nopales se encuentran ya en la etapa de senescencia a los 10 días de almacenamiento. Por otra parte, en el cultivar 'Milpa Alta' la actividad de SOD fue un 50% menor que en 'Atlixco' y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ), observándose claramente que la respuesta en la actividad de esta enzima está en función del genotipo del producto.

No existen reportes sobre la actividad de SOD en cladodios de nopal envasados en atmósfera modificada (EAM). Sin embargo, en otros productos hortofrutícolas también se ha reportado una disminución en la actividad de ésta enzima, como en esparrago (*Asparagus officinalis*) en este trabajo también se reportó que el producto EAM presentó 5 veces mayor actividad de SOD respecto al grupo testigo. En este contexto, pudiera pensarse que la enzima SOD no siempre responde a las condiciones de estrés presentes durante el almacenamiento de los productos y por otra parte el EAM retarda la actividad metabólica en el NMP (An y col., 2007).



**Figura 21. Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa en los cultivares 'Atlixco' (—●—) y 'Milpa Alta' (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.**

Contrario al comportamiento de SOD, las actividades de APX y de CAT incrementaron con el almacenamiento en todos los tratamientos. En la Figura 22 se muestra que la actividad de la APX del cultivar 'Atlixco' fue tres veces mayor comparada con la de 'Milpa Alta' ( $P \leq 0.05$ ) y

además, ésta dependió de la atmósfera modificada, encontrándose que en AP la actividad alcanzada a los 10 días del almacenamiento ( $5 \times 10^{-3}$  UI mg proteína<sup>-1</sup>) fue equivalente a la observada a los 20 días en la AN<sub>2</sub>. La actividad de esta enzima en los nopales control de 'Atlixco' alcanzó niveles de  $3 \times 10^{-3}$  UI mg proteína<sup>-1</sup>. En el cultivar 'Milpa Alta' no se encontraron diferencias significativas en la actividad de APX entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

El incremento mostrado en la actividad de esta enzima en todos los tratamientos (AN<sub>2</sub>, AP y testigo), podría explicarse por el hecho de que APX depende de la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es generado por diferentes rutas metabólicas, tales como la foto-respiración, la respiración, por actividad de la SOD y por la ruta de los fenilpropanoides (Kang y Saltveit, 2001, Jacobo-Velázquez y col., 2011). En los cladodios de nopal, el estrés por herida es bastante agresivo y por lo tanto se espera la mayor respuesta del tejido a través de la activación de la ruta de los fenilpropanoides que está estrechamente ligada a los procesos de cicatrización y con ello la presencia y aumento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula. Así entonces, la mayor respuesta en la actividad de APX observada en el cultivar 'Atlixco', estaría indicando que este cultivar posee un sistema antioxidante de APX más eficiente que 'Milpa Alta'.

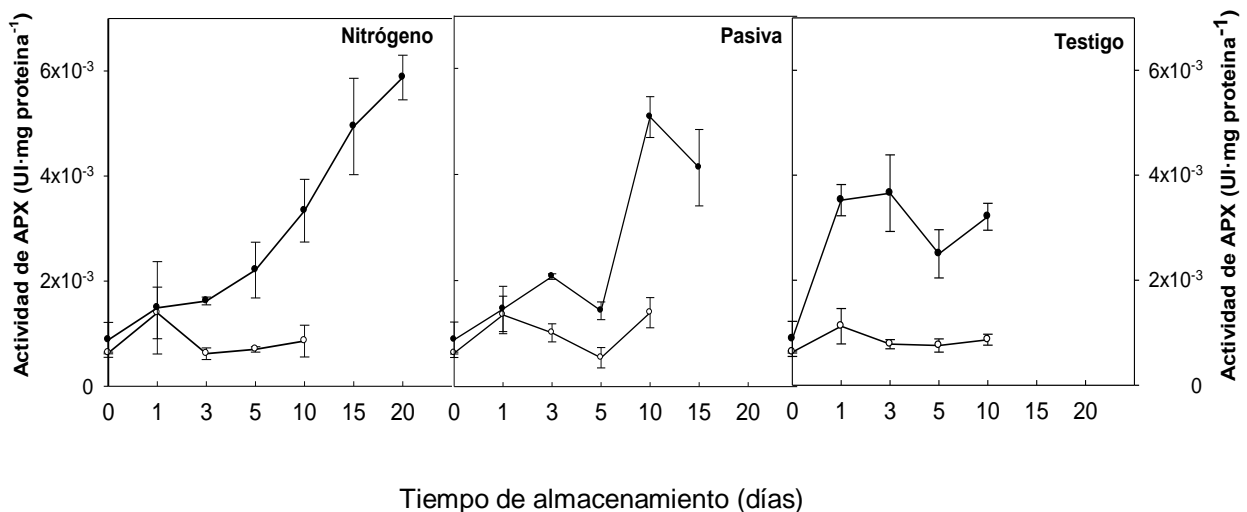
Los resultados obtenidos son congruentes con lo reportado por Jacobo-Velázquez y col., (2011) quienes señalan que los incrementos en la actividad de APX ocurren en respuesta a diferentes condiciones de estrés, entre ellos el estrés por herida, tal como se observó en rebanadas de zanahoria (*Daucus carota*) envasadas en condiciones de hiperoxia (80% O<sub>2</sub>) en donde se demostró que el aumento de la actividad de APX estuvo asociado al exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> procedente de la ruta NADPH oxidasa y de los fenilpropanoides. Otros tipos de estrés que activan a la APX son el estrés fotooxidativo, como el encontrado en la actividad de la isoenzima cAPX asociado a una reducción en el daño oxidativo en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) (Yoshimura y col., 2000) y el estrés hídrico, evaluado en hojas de almendra en el que el incremento en la actividad de APX fue proporcional a la reducción de los niveles de agua disponibles a la planta (Sorkheh y col., 2011).

Asimismo, en órganos vegetales como los frutos, existen evidencias de que el estado de madurez también es otro factor que influye en la actividad de APX, por ejemplo, Camejo y col., (2010) encontraron que APX exhibe el doble de actividad en frutos de durazno (*Prunus*

*pérsica*) en madurez de consumo comparado con el de madurez fisiológica, mientras que para el caso de chícharo se ha reportado que APX no cambia con el estado de madurez (Matamoros y col., 2010). De acuerdo con lo anterior, podría pensarse que los resultados obtenidos en la actividad de APX en los cladodios de nopal obedecen al efecto de dos tipos de estrés, el generado por el daño mecánico y el estrés fisiológico dado por el avance natural del desarrollo de los tejidos.

Con relación al comportamiento de la enzima APX por efecto de la atmósfera de almacenamiento en el cultivar 'Atlixco' se puede observar que en bajo estas condiciones la enzima responde al estrés en forma gradual, a medida que se acerca hacia el final del almacenamiento, es decir, aparentemente bajo estas condiciones se mantiene con actividad la enzimas. Mientras que el grupo testigo, que alcanzó la senescencia más rápidamente.

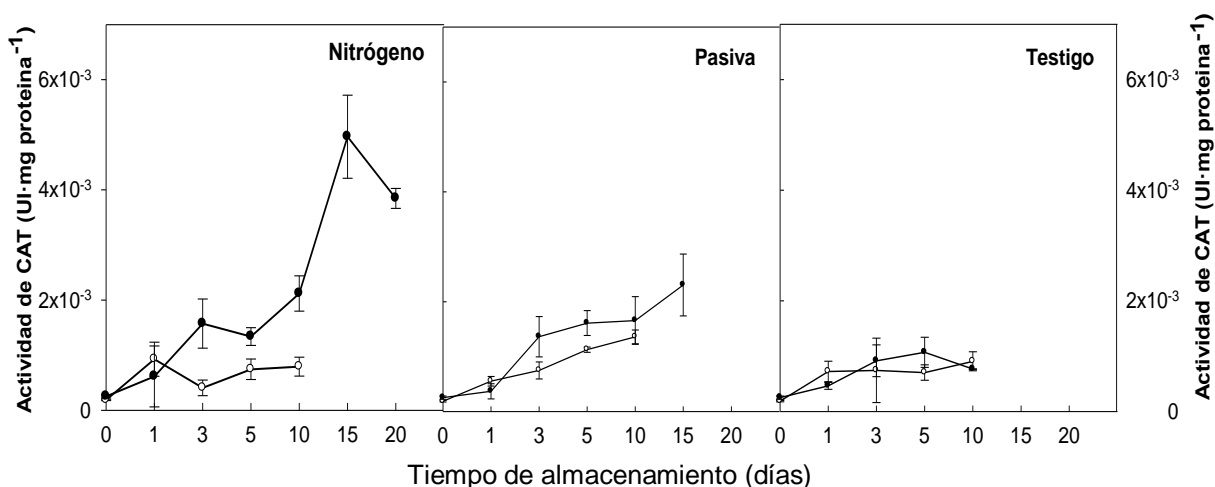
Por otra parte, en el cultivar 'Atlixco' la actividad de la enzima APX fue diferente por efecto de los tratamientos aplicados. Observándose que en las AN<sub>2</sub> y AP los NMP responden gradualmente al estrés y esto pudiera deberse a que bajo estas condiciones el estrés hídrico y los procesos de oxidación ocurren a una menor velocidad y dado que esta enzima responde al estrés se puede entender su comportamiento.



**Figura 22. Actividad específica de la enzima ascorbato peroxidasa en los cultivares 'Atlixco' (●) y 'Milpa Alta' (○), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.**

Por lo que respecta a la CAT, se encontró que en el tratamiento con AN<sub>2</sub> (Figura 23), la actividad de esta enzima aumentó significativamente (de  $2 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-3}$  UI mg proteína<sup>-1</sup>) en el cultivar 'Atlixco', siendo 3 veces más alta que en el cultivar 'Milpa Alta'. A pesar de que con el tratamiento de AP la actividad de la CAT en 'Atlixco' disminuyó significativamente (aproximadamente en un 50% con respecto a AN<sub>2</sub>), la tendencia fue la de aumentar gradualmente con el almacenamiento. En los nopales control, la actividad de CAT se mantuvo en bajos niveles ( $8 \times 10^{-4}$  UI mg proteína<sup>-1</sup>) y no se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los cultivares. Este comportamiento puede ser debido a que en AN<sub>2</sub> hay una mejor conservación de las defensas antioxidantes, capaces de depurar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula y se refleja en una mayor vida útil del producto (Anexo 1).

Cabe destacar que en la literatura se ha reportado que existe una estrecha relación entre la actividad de CAT y la vida postcosecha de productos hortofrutícolas. Mondal y col., (2004) al analizar dos cultivares de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) encontraron que los cultivares de mayor vida útil (14 d) presentaban 15% más actividad de CAT comparado con los cultivares de solamente 7 días de vida postcosecha. En un estudio anterior al citado, realizado en melón (*Cucumis melo* L.), se encontró que los cultivares de mayor vida útil presentaban incremento en CAT, sin embargo en otros cultivares se observó que la CAT había disminuido a través del tiempo y este comportamiento correspondía con los cultivares de menor vida postcosecha (Lacan y Bacou, 1998). En este sentido, podría pensarse que el genotipo de los cladodios de nopal del cultivar 'Atlixco' es el que está determinando que tenga una vida útil mayor.



**Figura 23. Actividad específica de la enzima catalasa en los cultivares 'Atlixco' (—●—) y 'Milpa Alta' (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.**

### 6.3 Efecto de las atmósferas modificadas en los compuestos antioxidantes no enzimáticos: fenoles y carotenoides totales

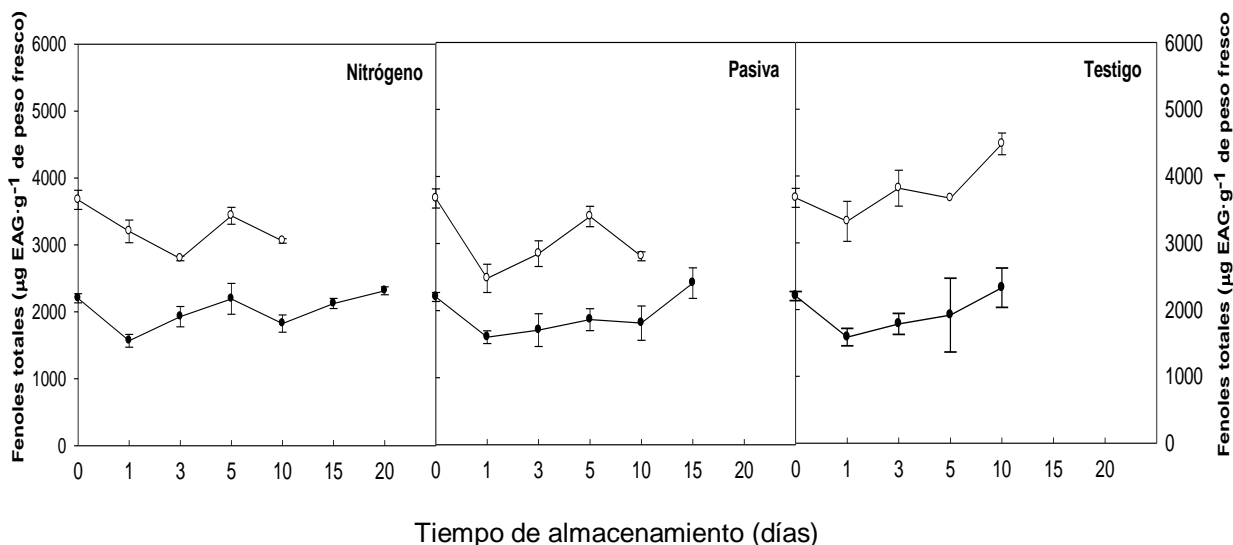
#### Compuestos fenólicos

En relación a los antioxidantes no enzimáticos, se encontró que el contenido de compuestos fenólicos totales fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en los nopales del cultivar 'Milpa Alta' en comparación con los del cultivar 'Atlixco' durante todo el periodo de almacenamiento (Figura 24). Este comportamiento se explica por la menor actividad de las enzimas antioxidantes y en consecuencia mayor acumulación de EROS en el tejido de los nopales de 'Milpa Alta', que aceleran los procesos oxidativos, observándose un mayor oscurecimiento asociado probablemente a los fenólicos contenidos en el producto al final del almacenamiento. El hecho de haber encontrado un 20% más en el contenido de fenoles totales en los nopales del testigo, comparado con los nopales tratados con las atmósferas modificadas, sugiere que las atmósferas modificadas ejercen un efecto controlador en el contenido de estos compuestos ya que, como se ha comentado, el estrés por herida y la presencia de  $O_2$ , incrementan los niveles de EROS que a su vez activan el metabolismo de los fenilpropanoides, en donde ocurre la síntesis de compuestos fenólicos y ligninas. Las ligninas intervienen en el proceso de cicatrización y los compuestos fenólicos pueden ser oxidados a quinonas por acción de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa, generando el

oscurecimiento (Artésy col., 1998; Hodges y Toivonen, 2008).

En el presente estudio, los nopales testigo estuvieron expuestos a un mayor nivel de oxígeno atmosférico, favoreciéndose en éstos el proceso oxidativo. Se ha reportado en zanahoria mínimamente procesada y envasada en atmósfera con 80% de O<sub>2</sub>, que los compuestos fenólicos se incrementaron en un 204 %, comparado con zanahorias frescas intactas (Jacobo–Velázquez y col., 2011), confirmando que tanto el daño mecánico como la atmósfera enriquecida en oxígeno incrementan el contenido de compuestos fenólicos, lo que es similar a lo encontrado en los cladodios de nopal.

Cabe destacar que en el cultivar ‘Atlixco’ no se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos aplicados. Estos resultados indican que existe una diferencia clara por genotipo entre los cultivares, y que en el caso del cultivar ‘Atlixco’ le está confiriendo una mayor tolerancia a los diferentes tipos de estrés a los que fueron expuestos los cladodios.



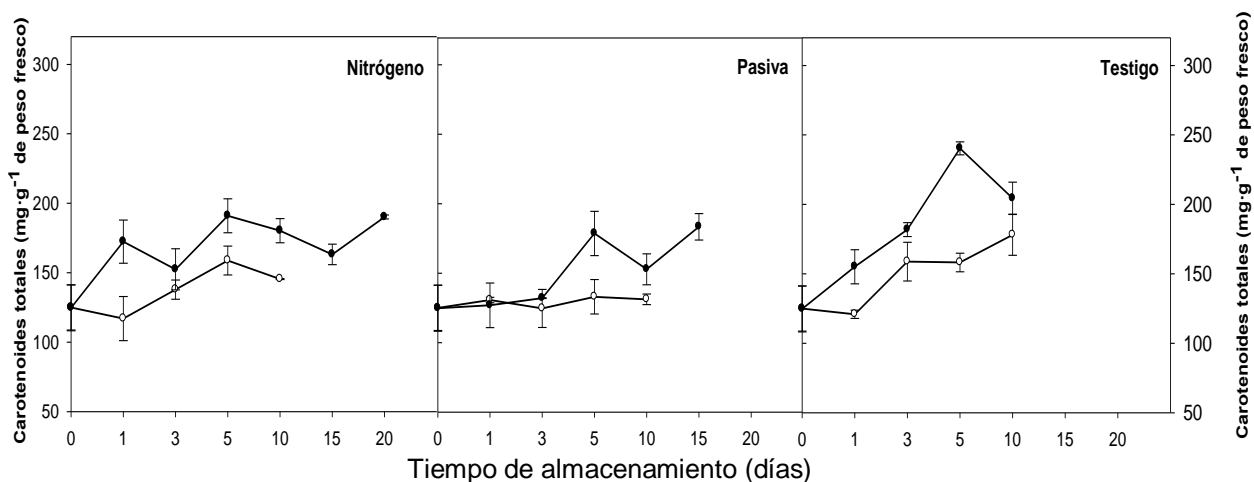
**Figura 24. Contenido de fenoles totales en los cultivares ‘Atlixco’ (—●—) y ‘Milpa Alta’ (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.**

### Carotenoides totales

Para el caso de los carotenoides, los nopales del cultivar 'Atlixco' exhibieron un contenido que superó en un 18%, en promedio, al cultivar 'Milpa Alta'. También se observó un incremento a través del tiempo en todos los tratamientos evaluados, que podría ser explicado por la función que estos compuestos tienen en la modulación de los niveles presentes del oxígeno singulete (generado en plastidios) y del radical peroxilo, los cuales se incrementan en la etapa de senescencia (Olmedilla y col., 2001; Asensi-Fabado y Munné-Bosch, 2010; Kleiny col., 2000; Kuky col., 2003).

Además, en este mismo cultivar se observó que, a partir del día 5, los carotenoides aparentemente se mantuvieron en menores niveles cuando se almacenan en atmósferas modificadas con respecto a los del grupo testigo (Figura 25). Sin embargo, esta diferencia no resulta ser significativa cuando se considera que la pérdida de agua fue de 4% en el testigo y 0.4 % en los nopales almacenados en AN<sub>2</sub> y AP, de acuerdo con un trabajo reportado previamente (Osorio-Córdoba, 2011). En otras palabras, lo que se observa en los cladodios del grupo testigo, es un aumento "aparente" en la concentración de carotenoides debido a la pérdida de agua, por lo que pudiera pensarse que no existen diferencias entre tratamientos.

En la literatura, no hay reportes relacionados con el efecto de las atmósferas modificadas sobre el contenido de carotenoides en nopal; sin embargo, existen algunas investigaciones en otros productos hortofrutícolas. Así por ejemplo en chile (*Capsicum annuum*) mínimamente procesado almacenado en atmósferas modificadas a 4.4 °C, el contenido de carotenoides se mantuvo en un 96% durante el almacenamiento (13 días), sugiriendo que este comportamiento se debió a que hay menor oxidación de estos compuestos en EAM dadas las condiciones de bajo oxígeno (Howard y Hernández-Brenes, 1997). Mientras que, en durazno mínimamente procesado se observó un incremento en el contenido de β-caroteno tanto en los duraznos control, como los almacenados a 5°C en atmósferas modificadas (Palmer y Kader, 1997). De acuerdo con los resultados obtenidos en nopal, los carotenoides son los compuestos que no se afectan significativamente bajo condiciones de estrés por herida o estrés causado por bajos niveles de O<sub>2</sub> y temperatura.



**Figura 25.** Contenido de carotenoides totales en los cultivares 'Atlixco' (—●—) y 'Milpa Alta' (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

#### 6.4 Efecto de las atmósferas modificadas sobre la capacidad antioxidante

Los productos vegetales están constituidos por diversos compuestos funcionales con carácter hidrosoluble o liposoluble, de acuerdo con su estructura molecular. La diferencia en la polaridad de estos compuestos sugiere que para llevar a cabo una extracción eficiente y la mayor cuantificación de la capacidad antioxidante en el producto, es necesario utilizar disolventes con distinta polaridad que permitan la solubilidad de grupos funcionales específicos presentes en el NMP. Autores como Zhao y col. (2006) y Pellegrini y col. (2007) reportaron que en productos como: espinaca (*Spinacia oleracea*), cebolla roja (*Allium cepa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y naranja (*Citrus sinensis* L.) se encontraron diferentes compuestos antioxidantes por efecto del disolvente utilizado en la extracción. De manera que al utilizar acetona pueden ser extraídos:  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, clorofilas y algunos ácidos fenólicos (por ejemplo, cafeico y ferúlico), mientras que en los extractos de metanol se cuantificó ácido ascórbico, flavonoides y ácidos fenólicos como epicatequina y el ácido siríngico.

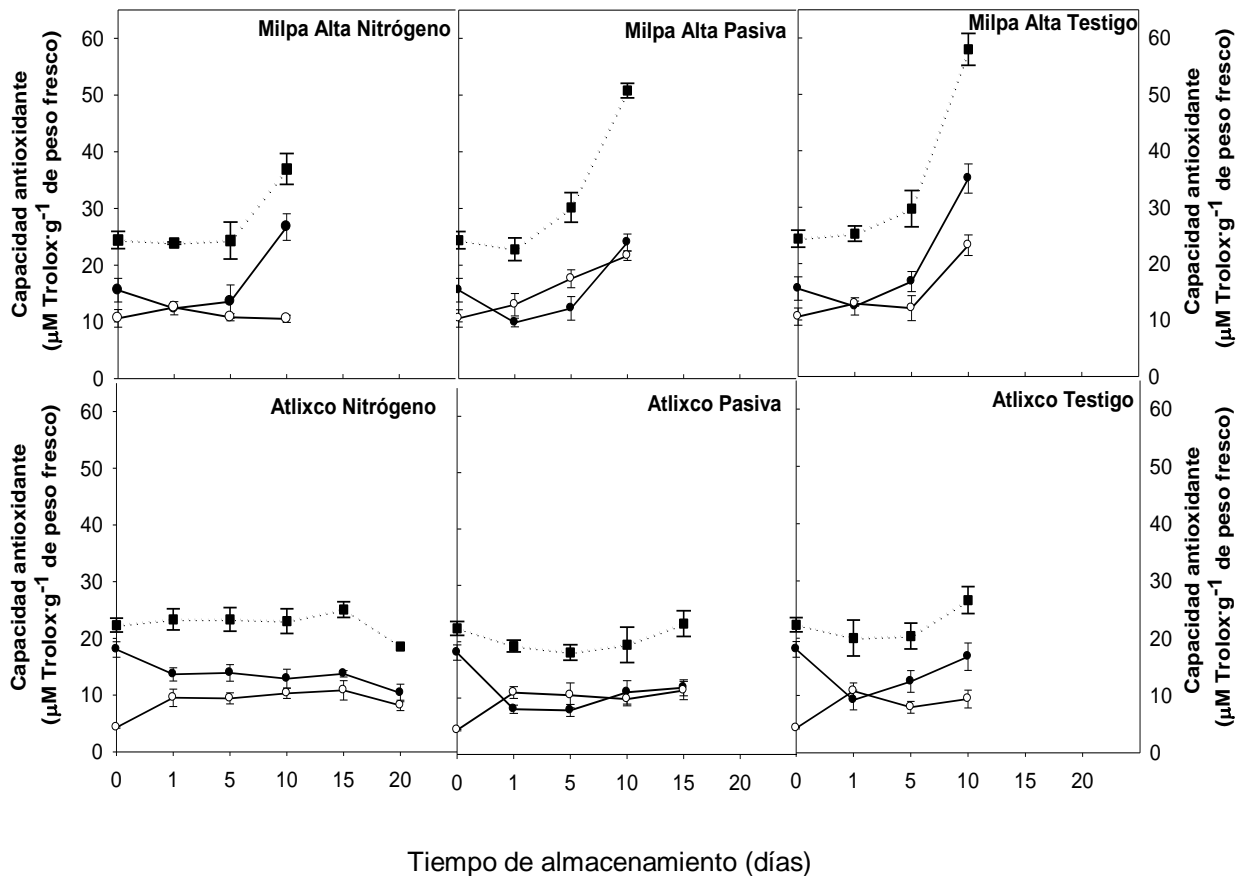
Los resultados obtenidos indicaron que el tipo de disolvente tuvo un efecto en la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), siendo los nopales envasados en AN<sub>2</sub> y el testigo los que presentaron dos veces más contenido al utilizar acetona con respecto al metanol



(día 10), lo que indica que en este producto predominan grupos funcionales de polaridad intermedia, tales como carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol, flavonoides y ácidos fenólicos, reportados previamente en otros productos hortofrutícolas (Pellegrini y col., 2007). Adicionalmente, por efecto de la atmósfera modificada se reduce la capacidad antioxidante total, observándose que los nopales del grupo testigo presentaron 20% más contenido que los almacenados en atmósfera pasiva y 40 % más que los almacenados en AN<sub>2</sub>. Este comportamiento se explica por los bajos niveles de oxígeno presentes en los envases, los cuales retardan la degradación de los compuestos antioxidantes, mientras que en los nopales del grupo testigo, se favoreció la síntesis de compuestos fenólicos (oxígeno disponible), cuantificándose una mayor TEAC en el producto.

Respecto al cultivar 'Atlixco', no hubo cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) por efecto del disolvente, en los nopales envasados en atmósfera modificada. Pero en los nopales del grupo testigo, sí se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ), presentándose 44% más TEAC en los extractos de acetona respecto a los de metanol, hacia el final del almacenamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos, los niveles en la capacidad antioxidante dependen de los grupos funcionales que predominan en cada cultivar. Lo cual coincide con lo reportado por otros autores, quienes encontraron que en diferentes cultivares de *Opuntia spp.* el contenido fenólico se correlaciona altamente con la capacidad antioxidante (Lee y col., 2002; Corral-Aguayo y col., 2008).

Además de analizar el comportamiento de la capacidad antioxidante por efecto del disolvente, también se consideró apropiado obtener la capacidad antioxidante total (TAC), que resultó de sumar los extractos de acetona y metanol. Los resultados obtenidos mostraron que 'Milpa Alta' presentó valores más altos (30-60  $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$  de peso fresco) que 'Atlixco' (20-25  $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$  de peso fresco). Lo cual se explica por la composición antioxidante en cada uno de los cultivares; es decir, en los NMP del cultivar 'Atlixco' predominan carotenoides y no fenólicos, y la técnica utilizada para cuantificar capacidad antioxidante (ABTS<sup>•+</sup>) es específica para fenólicos, presentándose probablemente una subestimación de la capacidad antioxidante en la muestra con la técnica utilizada (Huang y col., 2005, Yoo y col., 2007). En el cultivar 'Milpa Alta' se presentó un incremento en la capacidad antioxidante equivalente a Trolox en todos los tratamientos evaluados (Figura 26).



**Figura 26.** Capacidad antioxidante en los cultivares 'Milpa Alta' y 'Atlixco' envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a  $4\pm 1$  °C. Primera extracción con acetona (—●—), segunda extracción con metanol (—○—) y capacidad antioxidante total (considerando ambas extracciones) (----■----). Cada valor es el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

### 6.5 Efecto de las atmósferas modificadas sobre la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos (PPO y PAL)

En la síntesis y oxidación de compuestos fenólicos, metabolismo asociado al oscurecimiento de los vegetales, están involucradas diversas enzimas tales como la polifenol oxidasa (PPO) y la fenilalanina amonio liasa (PAL), entre otras (Pourcel y col., 2006).

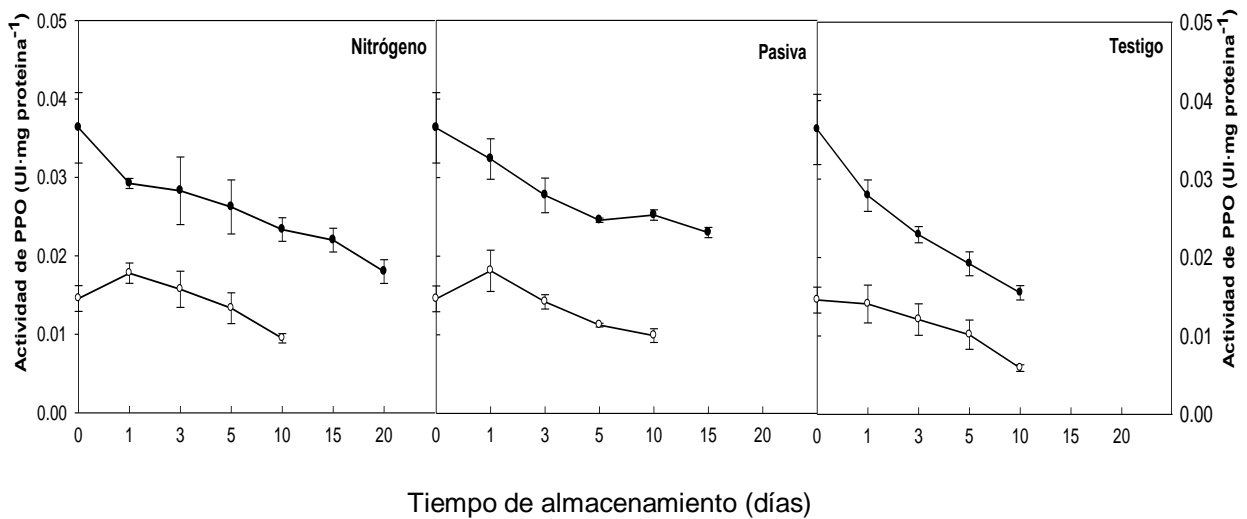
Los resultados obtenidos en la actividad de la enzima PPO mostraron una disminución a través del tiempo en todos los tratamientos evaluados y en ambos cultivares. Las diferencias significativas en la actividad de esta enzima ( $P\leq 0.05$ ) se presentaron por efecto de la

atmósfera modificada y del cultivar. El cultivar 'Atlixco' presentó dos veces mayor actividad de PPO con respecto al cultivar 'Milpa Alta' (Figura 27).

Los nopales del cultivar 'Atlixco' envasados en AN<sub>2</sub> y AP no presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) manteniendo una actividad de PPO en el rango de 0.36-0.20 UI mg proteína<sup>-1</sup>, mientras que los NMP del grupo testigo mostraron la menor actividad de PPO (0.36-0.15 UI mg proteína<sup>-1</sup>). Por otra parte, los NMP del cultivar 'Milpa Alta', no mostraron diferencias significativas en la actividad de PPO por efecto de los tratamientos (AN<sub>2</sub>, AP y testigo). Sin embargo se observó una considerable reducción de la actividad de la enzima durante los 10 días de almacenamiento del producto (0.0014-0.005 UI mg proteína<sup>-1</sup>).

Las diferencias observadas entre los cultivares pueden deberse al genotipo de las mismas, mientras que la disminución en la actividad enzimática se explica porque la temperatura óptima de la polifenoloxidasasa es entre 10 a 30 °C con un máximo en su actividad a 20 °C y dadas las condiciones en la que se almaceno el producto (4 °C) ocurrió una inactivación de la enzima (Cob y col., 2010). Por lo anterior se concluye que la enzima PPO no está participando en el oscurecimiento del NMP.

En NMP no existen reportes que indiquen el comportamiento de la PPO en el almacenamiento refrigerado, sin embargo, en otros productos como pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenada a  $3 \pm 1$  °C durante 21 días se redujo en un 50 % la actividad inicial de la PPO, asimismo en aguacate mínimamente procesado, se reportó que la actividad de PPO disminuyó por efecto de bajas temperaturas (Balois-Morales y col., 2007; Zarazúa- Escobar y col., 2005), lo cual permite explicar que los nopales del grupo testigo (sin atmósfera modificada) que estuvieron más expuestos al frío fueron los que presentaron una mayor inactivación de PPO.



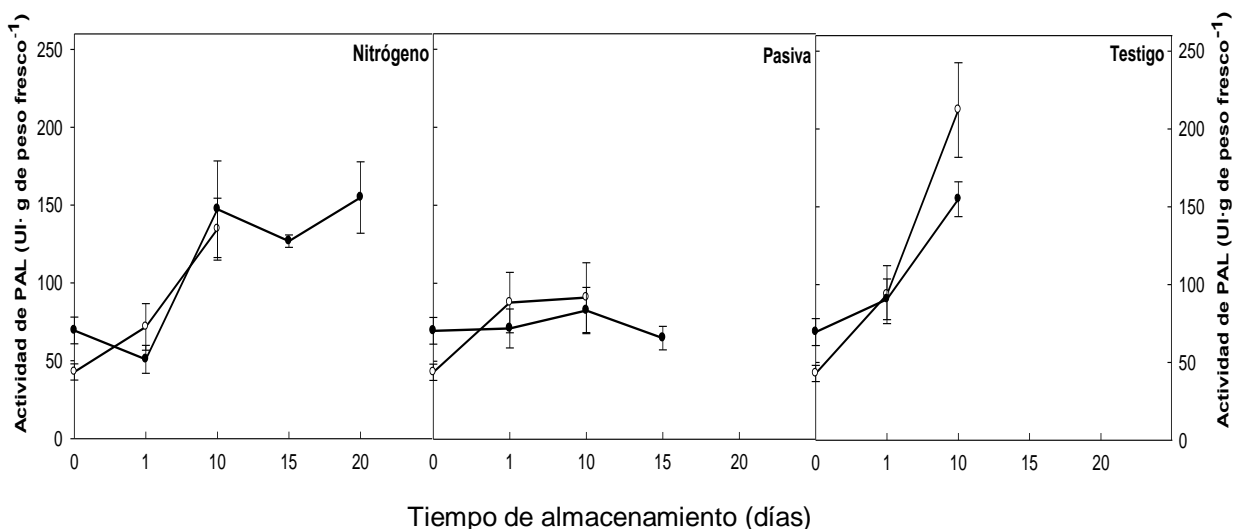
**Figura 27. Actividad específica de la enzima polifenoloxidasas en los cultivares 'Atlixco' (—●—) y 'Milpa Alta' (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a  $4\pm 1$  °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.**

Por otra parte, la enzima PAL incrementa a través del almacenamiento en todos los tratamientos evaluados y además ambos cultivares de NMP exhibieron un comportamiento diferente por efecto de la atmósfera de almacenamiento (Figura 28). En  $AN_2$  no hubo diferencias significativas ( $P\leq 0.05$ ) entre cultivares al día 10 y en este período se duplicó la actividad de PAL respecto a la inicial. En AP se registró la menor actividad de PAL comparado con el resto de los tratamientos ( $50-90$  UI·g de peso fresco<sup>-1</sup>) y no se mostraron diferencias entre los cultivares ( $P\leq 0.05$ ). Por último los nopales del grupo testigo si presentaron diferencias significativas entre cultivares ( $P\leq 0.05$ ), observándose que en el día 10 los NMP del cultivar 'Milpa Alta' incrementaron 4 veces su actividad enzimática y 'Atlixco' el doble.

El incremento en la actividad de la PAL puede atribuirse al hecho de que esta enzima está involucrada en los procesos de cicatrización en respuesta al estrés por herida que se presenta cuando el nopal se desespina (Jiang y Joyce, 2003). Por otra parte, la mayor actividad de la enzima en el cultivar 'Milpa Alta', se puede explicar porque, como se ha señalado previamente, posee un mayor contenido fenólico en comparación con el cultivar 'Atlixco', confirmando la participación de esta enzima, en la síntesis de éstos compuestos asociados con el oscurecimiento del NMP. Finalmente, la mayor actividad de PAL en los

nopales del grupo testigo respecto los envasados en AM, pudiera deberse a que fueron expuestos a diversos tipos de estrés tales como: estrés por temperatura, estrés hídrico, además del estrés por herida a lo que habría que agregarle que en este tratamiento no hubo restricción en el oxígeno disponible el cual favoreció la síntesis de compuestos fenólicos.

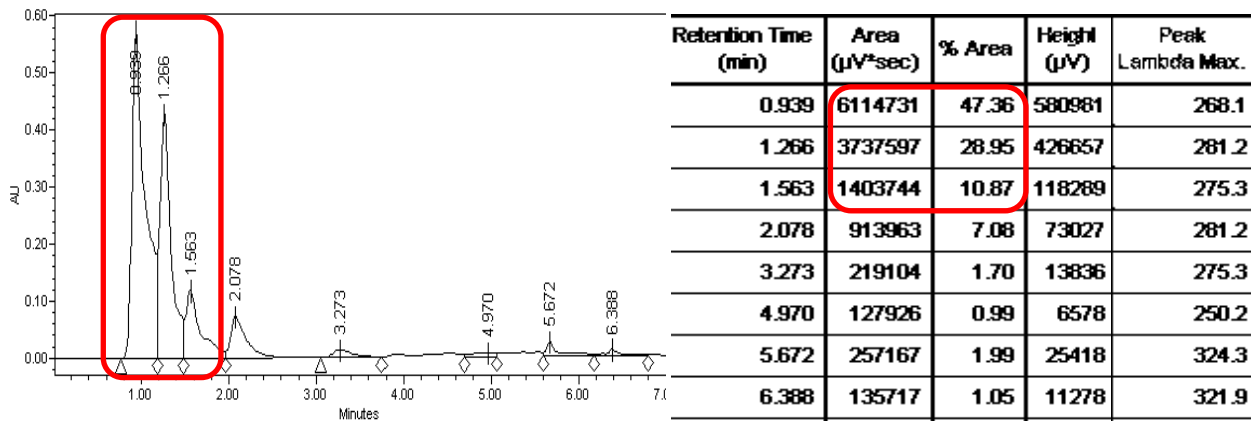
Por otra parte, las diferencias observadas en el comportamiento de los nopales envasados en AM pueden asociarse a la baja solubilidad del  $N_2$  en agua ( $0.016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que dificulta la permeabilidad de este gas a través de la membrana celular, por lo que no interfiere con los procesos metabólicos de la enzima, además hay dos veces más  $O_2$  en el espacio de cabeza de estos envases comparado con los NMP envasados en AP.



**Figura 28.** Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en los cultivares de nopal 'Atlixco' (—●—) y 'Milpa Alta' (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a  $4\pm 1$  °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

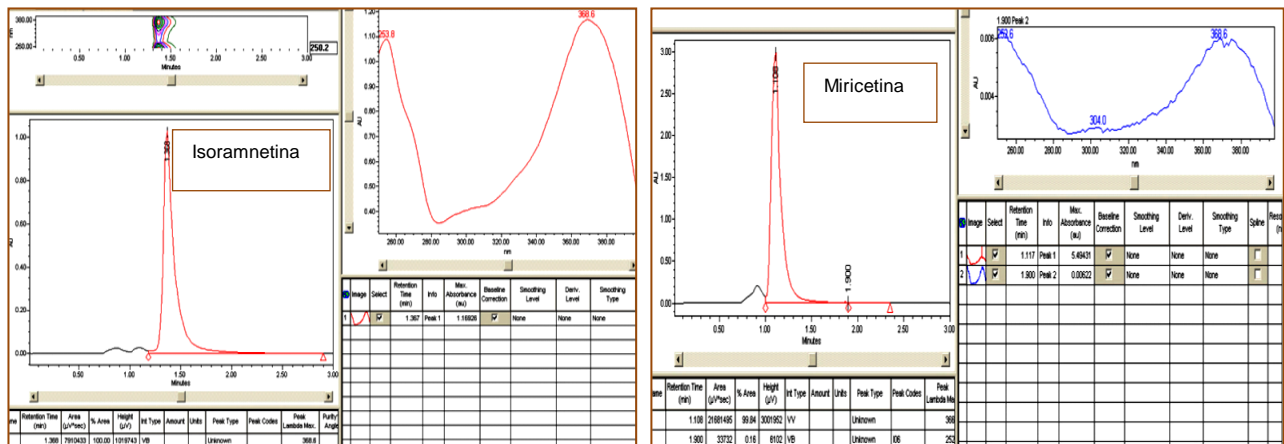
## 6.6 Efecto de las atmósferas modificadas en el contenido de flavonoides

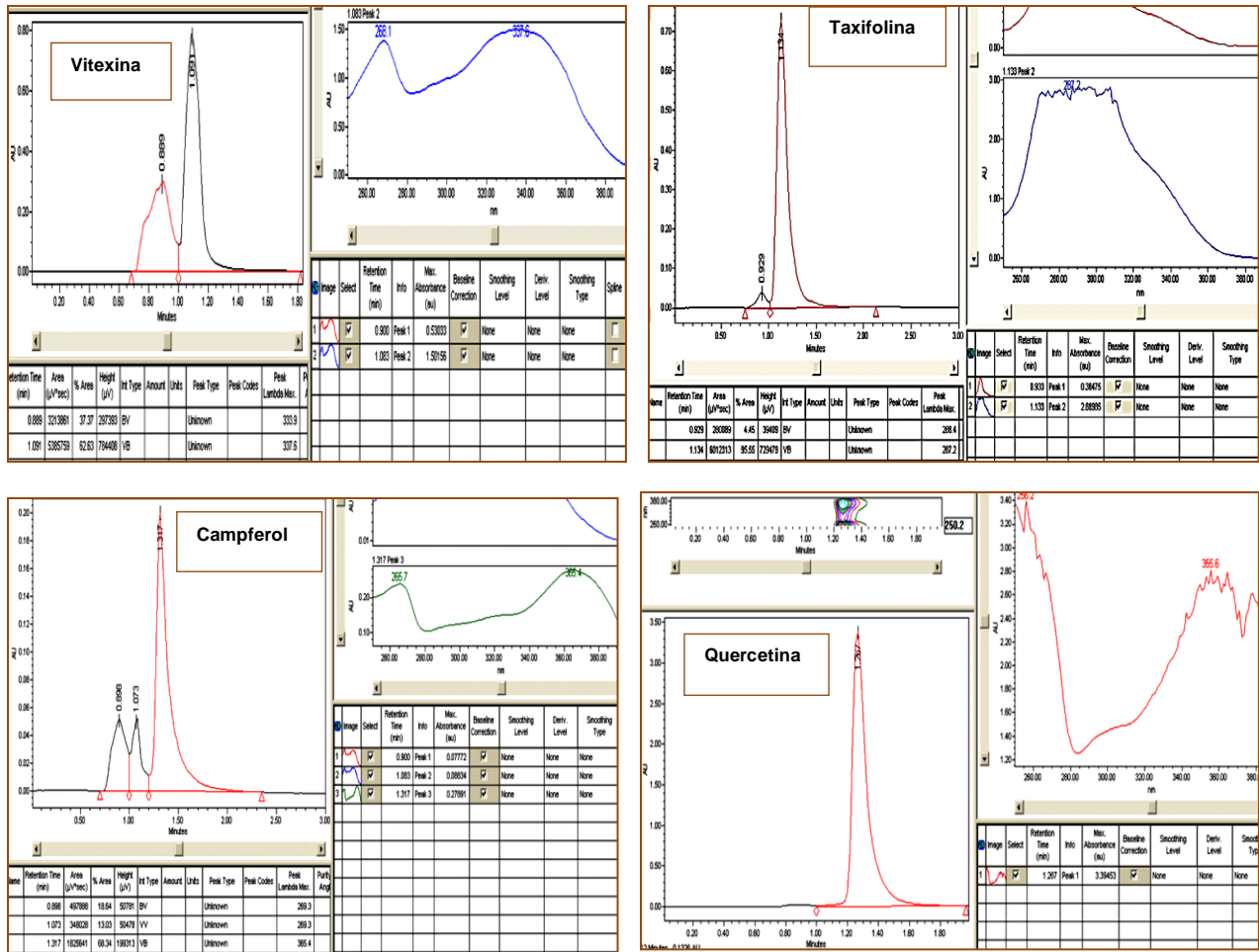
En la Figura 29 se presenta el cromatograma correspondiente a los compuestos flavonoides contenidos en el NMP del grupo testigo al día cero, observándose siete diferentes picos, de los cuales los tres primeros representan el 88% del área total.



**Figura 29. Cromatograma de los flavonoides presentes en nopal mínimamente procesado almacenado sin atmósfera modificada a 4±1°C.**

Adicionalmente se evaluaron seis diferentes estándares (vitexina, taxifolina, campferol, quercetina, miricetina e isoramnetina), que de acuerdo con Stintzing y Carle (2005), están presentes en NMP. Los resultados correspondientes al espectro de absorción y el tiempo de retención de cada estándar evaluado se presentan en la Figura 30.





**Figura 30. Cromatograma de los estándares de los flavonoides vitexina, taxifolina, quercetina, campferol, miricetina e isoramnetina**

No obstante, al comparar el tiempo de retención de los estándares evaluados y los compuestos presentes en la muestra, no se encontró una correspondencia entre ellos. Por lo cual las muestras de NMP y los estándares se evaluaron en un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo acoplado a un cromatografo de líquidos, Marca Waters modelo SYNAPT GS-2 y no se fue posible asociar los estándares evaluados con los compuestos presentes en la muestra (Anexo 2).

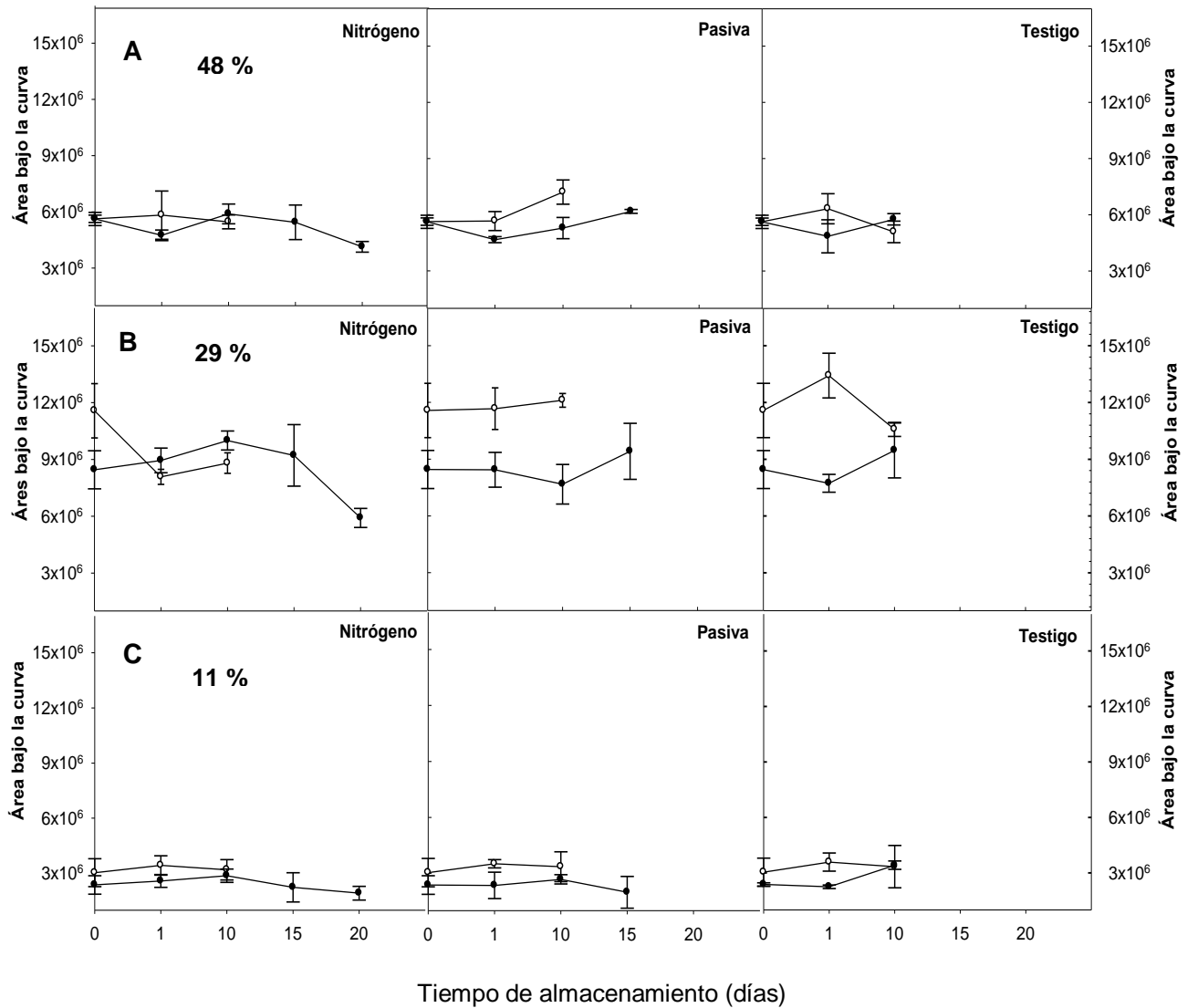
Por lo cual, se reporta el comportamiento de los tres primeros compuestos presentes en el NMP, por ser los que se encuentran en mayor proporción y en trabajos posteriores a través de cromatografía de masas se buscara la identificación de éstos (Figura 31).

Los resultados obtenidos indicaron que ambos cultivares de NMP ('Milpa Alta' y 'Atlixco') envasados con nitrógeno y los del grupo testigo, conservaron el contenido inicial del primer compuesto sin cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 31-A). Mientras que en atmósfera pasiva si se observaron diferencias significativas entre cultivares, siendo 'Milpa Alta' el que presentó 20 % más contenido de flavonoides respecto a 'Atlixco'.

Por otra parte, en la Figura 31-B se exhibe el comportamiento del segundo compuesto, donde el cultivar 'Milpa Alta' envasado en AP contiene 36 % más contenido que 'Atlixco' y 10% más los del grupo testigo. Sin embargo, en ambos cultivares el envasado en  $AN_2$ , produjo una reducción en el contenido de flavonoides de aproximadamente 30% al final del almacenamiento. En relación al tercer compuesto presente en las muestras (Figura 31-C) no se encontraron cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) por efecto del cultivar o por la atmósfera de almacenamiento, manteniéndose el contenido inicial durante el almacenamiento.

Con la información que se tiene hasta este momento no es posible explicarse el comportamiento observado. Sin embargo resulta importante identificar en trabajos posteriores los metabolitos secundarios del nopal, ya que estos compuestos se asocian con la tolerancia a diferentes tipos de estrés en otros productos hortofrutícolas y la capacidad antioxidante de los mismos.





**Figura 31.** Área bajo la curva de los tres principales compuestos flavonoides (A, B y C) de dos cultivares de nopal, ‘Atlixco’ (—●—) y ‘Milpa Alta’ (—○—), envasados en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo a 4±1 °C. Cada valor es el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron que el envasado en AN<sub>2</sub> a 4±1 °C es una tecnología apropiada para la conservación de nopal mínimamente procesado.

El periodo de conservación depende del cultivar de nopal; el cultivar 'Atlixco' alcanzó una vida útil de 20 días y los NMP del cultivar 'Milpa Alta' 10 días.

La vida útil de los NMP de cada uno de los cultivares está asociada con su capacidad de respuesta de sus sistemas antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático frente a condiciones de estrés.

Los NMP del cultivar 'Atlixco' poseen enzimas antioxidantes como la catalasa y la ascorbato peroxidasa cuya actividad incrementa gradualmente a través del tiempo evitando la acumulación de  $H_2O_2$  en la célula y el daño oxidativo. Mientras que, los sistemas no enzimáticos tales como los fenoles y carotenoides totales, así como la capacidad antioxidante conservan los niveles iniciales durante el almacenamiento

En los NMP del cultivar 'Milpa Alta' se conservó la actividad inicial de APX durante los 10 días de almacenamiento, siendo 5 veces menor respecto al cultivar 'Atlixco', mientras que la actividad de CAT, a pesar de que se incrementó, fue 3 veces menor a la determinada en 'Atlixco'. Sin embargo, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante incrementaron durante el almacenamiento y fue mayor comparado con el cultivar 'Atlixco'.

En ambos cultivares la enzima SOD involucrada con la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  no participó en respuesta a las condiciones de estrés en las que se almacenó el producto. Asimismo la enzima polifenoloxidasas (PPO) no está participando en la oxidación de compuestos fenólicos.

En ambos cultivares de NMP, la enzima fenilalanina amoniliasa (PAL) respondió al estrés por herida y el incremento en su actividad puede asociarse con la síntesis de flavonoides.

La técnica utilizada para la extracción de flavonoides en NMP no permitió identificar los flavonoides vitexina, taxifolina, campferol, quercetina, miricetina e isoramnetina.

## VIII. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, como continuación de la línea de investigación se sugiere:

Cuantificar el contenido de flavonoides en NMP utilizando una extracción fría con metanol al 70 %, porque bajo estas condiciones están presentes estándares como vitexina y taxifolina, reportados en la literatura.

Profundizar en el mecanismo por el cual ocurre el proceso de cicatrización del tejido de NMP, considerando la cuantificación de ligninas.

Cuantificar la actividad de la enzima peroxidasa, involucrada en el proceso de pardeamiento enzimático en NMP.

## IX. LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzimology 105: 121-126.

An, J., Zhang, M., Lu, Q. 2007. Changes in some quality indexes in fresh-cut green asparagus pretreated with aqueous ozone and subsequent modified atmosphere packaging. Journal of Food Engineering. 78: 340–344.

Antolovich, M.; Prenzler, P.; Patsalides, E. McDonald, S.; Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 127: 183–198.

Ares, G., Lareo, C., Lema, P. 2007. Modified atmosphere packaging for postharvest storage of mushrooms. A review. Fresh Produce. 1 (1), 32–40.

Arias, E., González, J., Peiró, M., Oria, R., Lopez-Buesa, P. 2007. Browning prevention by ascorbic acid and 4-Hexylresorcinol: Different mechanisms of action on polyphenol oxidase in the presence and in the absence of substrates. Journal of food science. 72(9): 464-470.

- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase -a hidrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85: 235-241.
- ASERCA. 1999. Consejo Mexicano del Nopal y Tuna. *Revista Claridades Agropecuarias*. Núm. 71.
- Atkins, P.V., 1994. Le proprieta' delle miscele semplici. In: *Chimica Fisica*, 5 ed. Zanichelli S.P.A., Bologna, p. 208.
- Avello, M., Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 494: 161-172.
- Badui, S. 2006. *Química de los Alimentos*. Cuarta edición. Ed. Pearson. México. 716 p.
- Balois-Morales, R., Colinas-León, M., Peña-Valdivia, C., Chávez-Franco, S., Alia-Tejagal, I. 2007. Sistema de estrés oxidativo, fenoles-polifenol oxidasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 13(2): 115-120.
- Belitz, H; Grosch, W. 1997. *Química de alimentos*. 2ª edición. Editorial Acribia, España. pp. 1087.
- Bergmeyer, H. 1995. *Methods of Enzymatic Analysis*. Tercera edición. Ed. Donald W. Moss. Alemania. pp. 265-293.
- Bidawid, S., Farber, J. M., Sattar, S. 2001. Survival of hepatitis A virus on modified atmosphere-packaged (MAP) lettuce. *Food Microbiology*. 18: 95–102.
- Biruete-Guzmán, A.; Juárez-Hernández, E.; Sieiro-Ortega, E.; Romero-Viruegas, R.; Silencio-Barrita, J. 2009. Los nutraceuticos: Lo que es conveniente saber. *Revista mexicana de pediatría*. 76(3): 136-145.
- Bravo, H. 1978. *Las cactáceas de México*. Vol.I. Segunda edición. Universidad Autónoma de México. México.

- CODEX STAN 185. (1993). Norma del CODEX para el nopal. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net/web/standardlist>. Consultado el 3 de septiembre de 2010.
- Cob, N., Tello, J., Escamilla, J., Vargas, L., Tamayo, J. 2010. Actividad de la polifenoloxidasas en el gel de sábila (*Aloe vera* Mill.). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 11 (2): 221-227
- Damodaran, S., Parkin, K., Fennema. O. 2010. Fennema Química de los alimentos. Cuarta edición. Ed. ACRIBIA. España. 1154 p.
- Del Valle, J.; Palma, M. 1997. Preservación II: Atmósferas controladas y modificadas. In: Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED) (Eds.), Temas en Tecnología de Alimentos (pp. 89-130). México.
- Diaz-Perez, J., Bautista, S., Villanueva, R. 2000. Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*. 18: 67–73.
- Dicko, M., Gruppen, H., Traoré, A., Voragen, A., Berkel, W. 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1 (1): 21-38.
- Douglas, C. 2006. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in plant science*. 1 (6): 171-178.
- Du, Z., Bramlage, J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1566-1570.
- Farber, J. N., Harris, L. J., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Gorney, J. R., Garrett, E. H., Busta, F. 2003. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 2: 142–160.

- Flores-Hernández A., Orona-Castillo I., Murillo-Amador B., Valdez-Cepeda R.D., García-Hernández J. 2004. Producción y calidad de nopalito en la región de la comarca lagunera de México y su relación con el precio en el mercado nacional. *J. Prof. Assos. Cactus Devel.* 6: 23.
- Fox, P. 1991. *Food Enzimology*. Vol. I. Elsevier Science Publishers. New York. 636 p.
- Flurkey, W., Joseph J. 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science.* 43(6):1826–1828.
- Gallegos-Vázquez, C., Valdez- Cepeda, R., Barrón-Macías, M., Barrientos Priego, A., Andrés- Agustín, J., Nieto-Ángel, R. 2006. Caracterización morfológica de 40 cultivares de nopal de uso como hortaliza del banco de germoplasma del Cruce-UACH. *Revista Chapingo.*12: 41-49.
- González-Aguilar, G., Gardea, A., Cuamea-Navarro, F. 2005. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. CIAD. México. 447-474.
- Gómez-Casanovas, N.; Blanc-Betes, E.; Gonzalez-Meler, M.; Azcon-Bieto, J. 2007. Changes in Respiratory Mitochondrial Machinery and Cytochrome and Alternative Pathway Activities in Response to Energy Demand Underlie the Acclimation of Respiration to Elevated CO<sub>2</sub> in the Invasive *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology.*145: 49–61.
- Gordon M.H. 2001. El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. En: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M (Eds.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas* (pp. 7- 21). Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Granados, D., Castañeda, A. 1991. *El Nopal: Historia, Fisiología, Genética e Importancia Genética*. Primera Edición. Ed. Trillas. pp. 13-29.
- Guevara, J., Yahia, E., Brito de la Fuente, E. 2001. Modified atmosphere packaging of prickly pear cactus stems (*Opuntia* spp.). *Lebensm Wiss. Technol.* 34:445-451.

- Guevara, J., Yahia, E., Brito, E., Biserka, S. 2003. Effects of elevated concentrations of CO<sub>2</sub> in modified atmosphere packaging on the quality of prickly pear cactus stems (*Opuntia spp.*). *Postharvest Biology and Technology*. 29: 167- 176.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Harborne, J., Simmonds, N. 1964. *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp. 101.
- Hodges, D., Andrews, C., Johnson, D., Hamilton, R. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany*. 48(310): 1105-1113.
- Huang, D., Boxin, O., Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Ishikawa, Y., Hirata, T., Hasegawa, Y. 1997. Development of simple gas permeability measurement for polymeric films on high gas permeability films for MA packaging of fresh produce. *Journal of Packaging Science and Technology*. 6: 213–220.
- Jiang Y., Fu J.R. 1999. Biochemical and physiological changes involved in browning of litchi fruit caused by water. *J. Hort. Sci. Biotech*. 74: 43–46.
- Jiang Y., Joyce, D. 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*. 39: 171–174.
- Joon, M., Takayuki, S. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 57: 1655–1666.
- Kader, A. 2007. *Tecnología Postcosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª edición. Universidad de California. 580 p.

- Kays, S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. Ed. AN AVI BOOK. New York. 532 p.
- Kohen, R., Nyska, A. 2002. Review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30 (6): 620–650.
- Kyung-Mi, Y., Dae-Ok, K., Chang-Yong, L. 2007. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16 (2): 177-182
- Kuk, Y., San- Shin, Ji., Burgos, N., Eak-Hwang, T., Han, O., Ho-Cho, B., Jung, S., Ock-Guh, J. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 43: 2109–2117.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 25(4): 726-732.
- Lee, L., Arul, J., Lencki, R., Castaigne, F. 1995. A review on modified atmosphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: physiological basis and practical aspects—part 1. *Packaging Technology and Science*. 8: 315–331.
- Lee H., Yoon, J.; Lee, B.; Choi, B.; Park, K. 2000. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition, and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. *Kor J. Pharmacognosy*. 31: 412–415.
- Lowry, O., Rosbrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.
- Madhavi, D., Deshpande, S., Salunkhe, D. 1996. Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. Marcel Dekker. New York. pp. 365-423.



- Madrid, A., Gómez, J., Santiago, F., Madrid, J., Madrid, J. 2003. Refrigeración, Congelación y Envasado de los Alimentos. Mundi-Prensa. España. 303 p.
- Martínez, I., Periago, M., Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(1):5-18.
- Marroquín, S.; Borja, C.; Velázquez, J. 1964. Estudio Ecológico Dasonómico de las Zonas Áridas del Norte de México. INIF, SAG. México.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science. 7(9): 405-410.
- Mondal, K., Sharma, N., Malhotra, S., Dhawan, K., Singh, R. 2004. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. Biología Plantarum. 48 (1): 49-53.
- Morales, C. 2009. Evaluación de la calidad del nopal (*Opuntia ficus indica*) variedad Milpa Alta desespinado, envasado en atmósferas modificadas. Tesis. UAM, México. 55 p.
- Mustafa, R., Hamid, A, Mohamed, S., Abu, F. 2010. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. Journal of Food Science. 75: 28-35.
- Nasar-Abbas, S., Plummer, J., Siddique, K., White, P., Harris, D., Dods, K. 2008. Nitrogen retards and oxygen accelerates colour darkening in faba bean (*Vicia faba* L.) during storage. Postharvest Biology and Technology. 47: 113–118.
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase on spinach Chloroplast. Plant and Cell Physiology. 22: 867-880.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I. 2001. Carotenoides y salud humana. Serie Informes. No. 11. Fundación Española de Nutrición. Madrid, España. pp. 13-15.

- Orvar, B. L., Ellis, B. E. 1997. Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant Journal*. 11: 1297-1305.
- Pellegrini, N., Colombi, B., Salvatore S., Brenna, O., Galaverna, G., Del Río, D., Bianchi, M., Bennett, R., Brighenti, F. 2007. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J. Sci. Food Agric.* 87: 107-111.
- Pérez, L. 2000. Estrés oxidativo: La paradoja del oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol.* 11(3):139-42.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2001. *Antioxidantes de los Alimentos: Aplicaciones Prácticas*. Ed. Acribia. España. pp. 39-161.
- Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*. 126: 445–462.
- Ponce, L. Flores, T., Arronte, M. 2005. Efectos de la ablación selectiva con láser en el desespinado de nopal. *Revista Cubana de Física*. 22 (1): 23-27.
- Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. 2006. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *TRENDS in Plant Science*. 12(1): 29-36.
- Purvis, A. C. 2004. Regulation of oxidative stress in horticultural crops. *HortSci*. 39, 930-932.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.

- Ramos, M., Batista, C., Gómez, B., Zamora, A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*. 8(1): 7-15.
- Raven, E. 2003. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: ¿What can we learn from ascorbate peroxidase?. *Nat. Prod. Rep.* 20: 367–381.
- Ríos, J., Quintana, M. 2004. Manejo general del cultivo del nopal: Manual del participante. Colegio de Postgraduados. Secretaria de la Reforma Agraria. Fondo de Tierras e Instalación del Joven Emprendedor Rural. México p. 81
- Rice-Evans, C., Diplock, A., Symons, M. 1991. *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier Science Publishing Company. New York. 291 p.
- Roberfroid, M., Buc, P. 1995. *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*. Marcel Dekker. United States of America. 272 p.
- Rodríguez-Amaya, D. B. 1999. *A guide to carotenoid analysis*. ILDI Press: Washington DC.
- Rodríguez, J., Menéndez, J., Trujillo, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 30:36-44.
- Rodríguez S., Questa A., Guzmán C., Casóliba R., Coronel M. 2006. Calidad microbiológica de vegetales mínimamente procesados. Proyecto XI.22 Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados. In: I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados. San Pedro, Brazil. pp. 99-106.
- Statistical Analysis System. (1989). *(SAS/STAT User's Guide) Version 6*. pp. 209–243. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON). 2006. Estadísticas agropecuarias. Disponible en: <http://www.sicomyt.com/>. Consultado el 10 de septiembre de 2013.

- Sáenz, C. 2004. Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia* spp. p. 211-222. En: Esparza, G., Valdez, R. y Méndez, S. (Eds). El Nopal, Tópicos de actualidad. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Scandalios, J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Singleton, V., Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 16: 144–158.
- Smith, J., Ramaswamy, H., Simpson, B. 1990. Developments in food packaging technology. Part II: Storage aspect. *Food Science Technology.* 1(5): 111-118.
- Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., 2001. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3685–3690.
- Stintzing, F.C.; Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. *Mol. Nutr. Food Res:* 49: 175-194.
- Toivonen, P.M.A. 2004. Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Hort Science.* 39: 938-942
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Ed. Springer. Netherlnds. 267 p.
- Vranová, E., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany.* 53 (372): 1227-1236.
- Wallace R., Gibson A. 2002. Evolution and systematics. En: Nobel PS (Ed.), *Cacti: Biology and Uses* (pp. 1-21). University of California: Press Berkeley-Los Angeles-London.



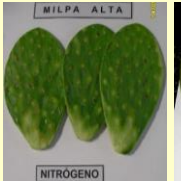










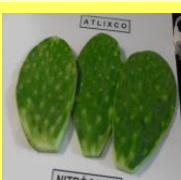













- Wang, J., Zhang, H. & Allen, R. D. 1999 Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 40: 725-732.
- Wiley, R. 1997. Frutas y Hortalizas Mínimamente Procesadas y Refrigeradas. Ed. Acribia, España. pp. 11-13.
- Wills, R., Graham, D., Joyce, D., McGlasson, B. 1998. Introducción a la Fisiología y Manipulación Poscosecha de Frutas, Hortalizas y Plantas Ornamentales. 2ª edición. Ed. Acribia. España. 240 p.
- Whitaker, J., Voragen, A., Wong, D. 2003. Handbook of food enzymology. Ed. Marcel Dekker. New York. 1108 p.
- Zarazúa- Escobar, J., Martínez-Damián, M., Colinas-León, M., Barrientos-Priego, A., Aguilar-Melchor, A. 2005. Frigoconservación y atmósferas modificadas en frutos de aguacate mínimamente procesado. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 11(1): 143-148.
- Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G. 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 7277-7286.

## X. ANEXOS

ANEXO 1

Apariencia de los nopales mínimamente procesados de los cultivares 'Atlixco' y 'Milpa Alta', almacenados a  $4 \pm 1$  °C en atmósfera modificada con nitrógeno, atmósfera pasiva y un testigo.

Tiempo de almacenamiento (días)

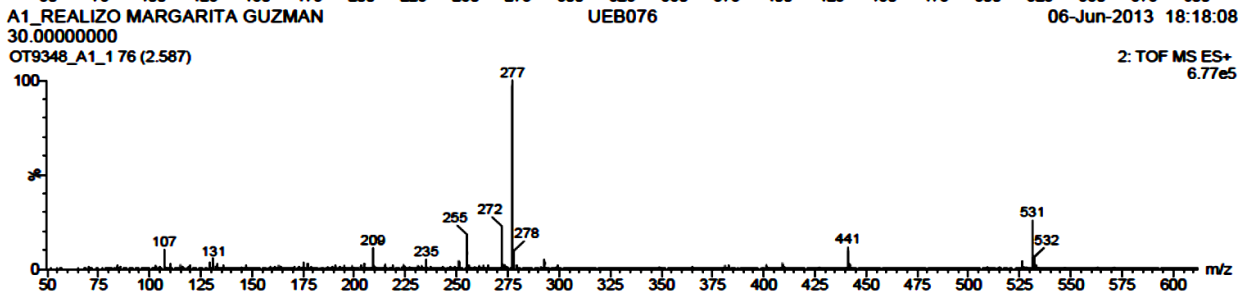
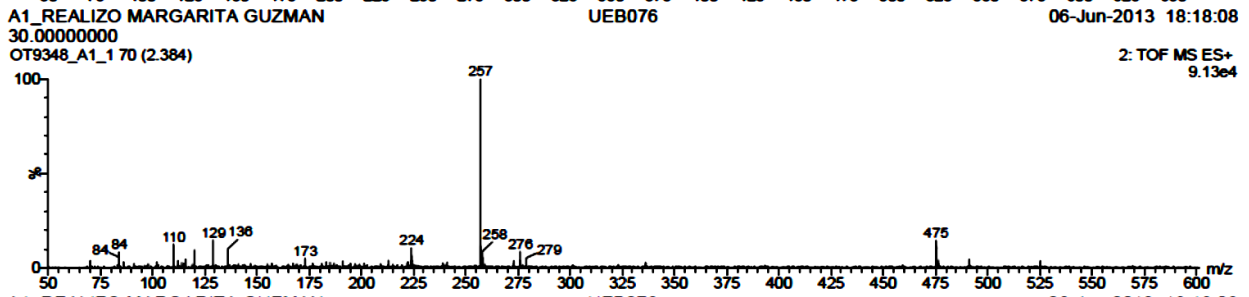
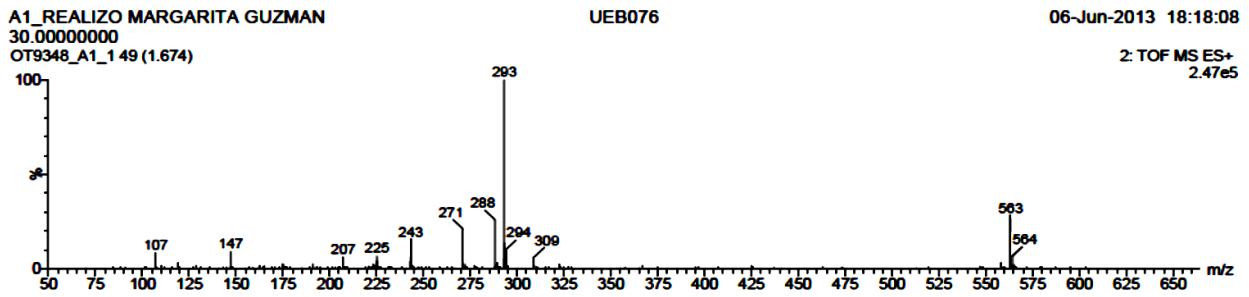
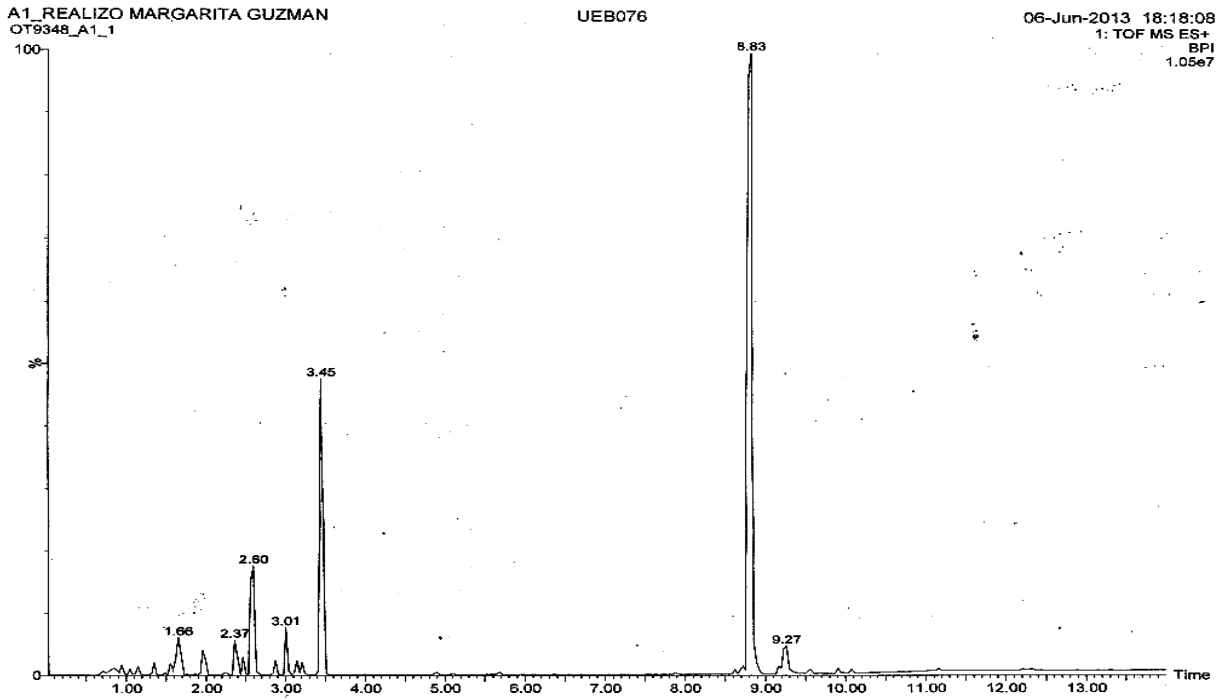
Cultivares	1	5	10	15	20	25	
<b>'MILPA ALTA'</b>	Nitrógeno						
	Pasiva						
	Testigo						
<b>'ATLIXCO'</b>	Nitrógeno						
	Pasiva						
	Testigo						

**ANEXO 2.**

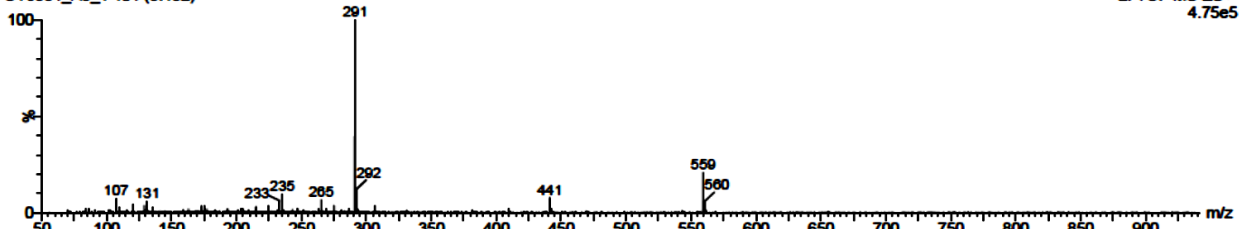
**Condiciones del espectrómetro de masas y cromatogramas obtenidos de muestras de nopal mínimamente procesado del cultivar 'Atlixco' almacenado a  $4\pm 1$  °C sin atmósfera modificada.**

Preparación de las muestras:	Se tomaron 60uL de cada muestra (extracto acuoso) y se diluyeron a proxímadamente a 100uL con agua Milli Q más 0.1% de Ac. Fórmico
Disolventes y Reactivos	<b>Agua Milli Q</b> <b>Acetonitrilo</b> grado LC-MS (Marca J.T. Baker, lote 0000020760) <b>Ac. Fórmico</b> (Marca J. T. Baker, lote B51341. 91.3%).
Introducción de la muestra:	Cromatografía de Líquidos (UPLC)
Columna	ACQUITY UPLC BEH, Fase Reversa C18, 1.7um, 2.1X100mm. Num. de serie: 01803016915356
Fase Móvil	<b>Fase A:</b> Agua Mill Q con 0.1% de Ac. Fórmico <b>Fase B:</b> Acetonitrilo con 0.1% de Ac. Fórmico
Velocidad de Flujo (Fase móvil)	0.3mL/min
Gradiente Cromatográfico	0 min 90%A 10%B 10min 10%A 90%B 15min 10%A 90%B 16min 90%A 10%B
	Electrospray
Temperatura de la cámara de ionización;	100°C
Voltaje del capilar:	3.00 kV
Intervalo de masas:	0-2000 u
Detección de iones:	Positivos
Resolución:	20,000

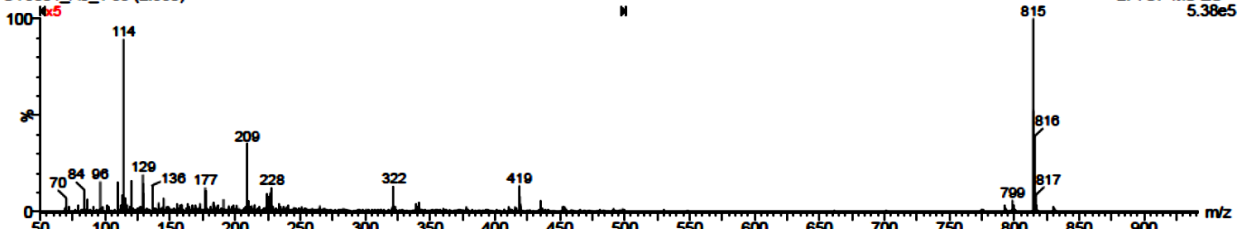




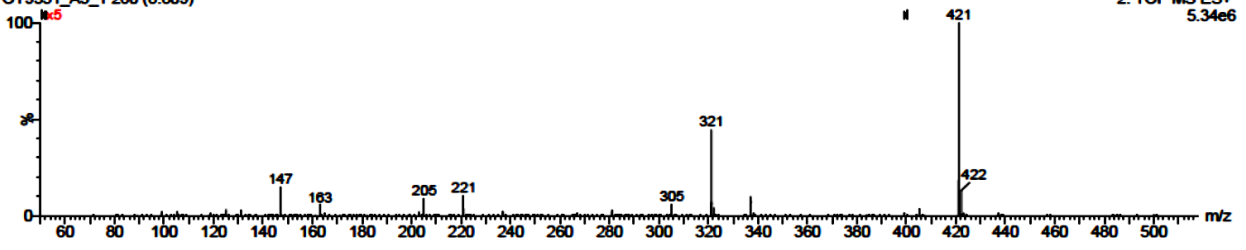
A1\_REALIZO MARGARITA GUZMAN UEB076 06-Jun-2013 19:08:57  
30.00000000  
OT9351\_A3\_1 101 (3.432) 2: TOF MS ES+ 4.75e5



A1\_REALIZO MARGARITA GUZMAN UEB076 06-Jun-2013 19:08:57  
30.00000000  
OT9351\_A3\_1 88 (2.993) 2: TOF MS ES+ 5.38e5



A1\_REALIZO MARGARITA GUZMAN UEB076 06-Jun-2013 19:08:57  
30.00000000  
OT9351\_A3\_1 260 (8.809) 2: TOF MS ES+ 5.34e6



MIRICETINA\_REALIZO MARGARITA GUZMAN UEB076 25-Jun-2013 17:58:18  
4.00000000  
MIRI\_1 102 (3.449) Cm (102:105) 1: TOF MS ES+ 3.31e7

