

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE  
NOPAL VERDURA Y SU RESPUESTA A LA ATMÓSFERA MODIFICADA COMO MÉTODO  
DE CONSERVACIÓN

**TESIS**

Para obtener el grado de

**Doctora en Biotecnología**

**PRESENTA**

Juliana Osorio Córdoba

**DIRECTOR DE LA TESIS**

Dra. Clara Pelayo Zaldívar

**ASESORES**

Dra. Mónica Ponce Valadez

Dr. José Ramón Verde Calvo

México, D.F. 22 de Septiembre de 2011

“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 001465”

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de frutas y hortalizas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Clara Pelayo Zaldívar.

México D.F. a 22 de Septiembre de 2011

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE  
NOPAL VERDURA Y SU RESPUESTA A LA ATMÓSFERA MODIFICADA COMO  
MÉTODO DE CONSERVACIÓN**

Que presentó

**Juliana Osorio Córdoba**


Comité Tutorial:

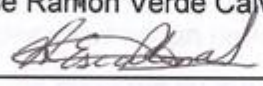
**Directora:** Dra. Clara Pelayo Zaldívar


**Asesora:** Dra. Mónica Ponce Valadez

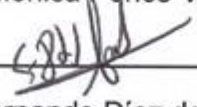
**Asesor:** Dr. José Ramón Verde Calvo

Jurado:

Presidente:   
Dr. José Ramón Verde Calvo

Secretario:   
Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal:   
Dra. Mónica Ponce Valadez

Vocal:   
Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

## ***Dedicatoria***

***“Todo pasó en el momento justo, en el lugar correcto, con las personas adecuadas”***

Yo no pedí venir a este mundo... Dios lo decidió así. Pero tengo la suerte de tener padres maravillosos que han hecho realidad todos mis sueños y siempre me han dado su apoyo. Gracias por estar siempre ahí, por creer en mí y ser parte de mi vida, sin ustedes no sería quien soy... *A mis padres Luis Emilio y Amanda.*

Desde hace 6 años te conozco y desde que llegaste a mi vida supe que eras la persona que siempre había esperado, gracias por todo lo que me has dado, por tu apoyo, confianza, por hacer siempre de mis sueños una realidad, por ser más que mi esposo mi amigo... *A mi Poncho.*

Antes de empezar este largo camino llegaste a mi vida, gracias por todas las sonrisas que me regalaste, por tus abrazos, por tu tiempo, por enseñarme a ser mamá y ahora que todo llega a su fin Dios me premia de nuevo enviándome otro ángel, Gracias por ser una bendición en mi vida... *A mis hijos Ana Sofía y Matías.*

Y a ustedes... *mi Santi y mi hermano Andrés* porque sé que a pesar de la distancia me apoyan, cuento con ustedes y me echan porras para que todo salga bien, Gracias por demostrarme cada día su amor a pesar de la distancia.

## ***Agradecimientos***

A la Dra. Clara Pelayo, por toda su confianza y apoyo, por creer en mí, por sus enseñanzas, paciencia y dedicación... Gracias a usted crecí profesional y humanamente. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, de conocerla, Gracias por siempre hacerme sentir como de la familia.

A los integrantes de mi Comité tutorial: Dr. Ramón, Moni y Fer por su excelente forma de guiarme y porque cada uno de sus consejos acertados hicieron de este un gran trabajo. Gracias por brindarme siempre su amistad.

A la Dra. Elsa Bosquez M. por brindarme su amistad, por sus consejos y su apoyo para enriquecer este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado y por el apoyo económico complementario otorgado (Proyecto 90610, 2008) para realizar esta investigación.

A Don Dago por todos los consejos que siempre me dio, por su apoyo para realizar los experimentos, por su ayuda siempre necesaria.

A mis compañeros de laboratorio: Liz, Iván, Rosa Isela y Leonor, gracias por escucharme, por apoyarme en los ratos difíciles, por los momentos de charla y risa que hicieron más ligeros los días y más amenas nuestras jornadas de trabajo.

A mis amigas de siempre, Clara y Luzma, porque a pesar de la distancia han estado siempre conmigo en las buenas y en las malas, por quererme a mí y a mi hijos... porque simplemente siempre están cuando las necesito.

A mi familia de aquí y de allá... Mis suegros, cuñados, sobrinos, a mis tíos, mi madrina, a Mauro que puedo decir... Gracias por creer en mí, por sentirse orgullosos de mis logros, por ayudarme cuando más los he necesitado, por todo su amor. A mi mamá mil gracias por aguantarme, por apoyarme, todo esto no hubiera sido posible si no estuvieras siempre a mi lado.

A todos mis compañeros de clase y a los que fuera de ésta siguieron siempre conmigo.

A todas las personas que siempre me regalaron una sonrisa cuando llegaba a trabajar, siempre fue agradable comenzar el día así.

Y aunque ahora soy mexicana... a mi amada Colombia... porque tuve el privilegio de nacer en una tierra que engendra gente pujante y echada pa adelante que siempre sonrío ante la adversidad y los problemas.

## Tabla de Contenido

	<b>Página</b>
Resumen	12
Abstract	15
1. Introducción	18
2. Objetivos Generales	23
3. Objetivos Específicos	24
4. Hipótesis	25
5. Artículo 1. Conservación de nopal verdura 'Milpa Alta' ( <i>Opuntia ficus indica</i> Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada	26
5.1 Resumen	26
5.2 Abstract	27
5.3 Introducción	27
5.4 Materiales y Métodos	30
5.4.1 Material biológico	30
5.4.2 Aplicación de tratamientos y diseño experimental	30
5.4.3 Atributos de calidad	31
5.4.4 Metabolitos de fermentación	33
5.4.5 Análisis estadístico	33
5.5 Resultados y Discusión	34
5.5.1 Atributos de calidad	34
5.5.2 Metabolitos de fermentación	39
5.6 Conclusiones	44
5.7 Agradecimientos	44
5.8 Referencias	45
6. Artículo 2. Conservation of fresh organic cactus stems ( <i>Opuntia ficus indica</i> Mill.) cv. Atlixco in modified atmospheres	51
6.1 Abstract	51
6.2 Introduction	52
6.3 Materials and Methods	54
6.3.1 Biological material	54
6.3.2 Experimental design and treatments	55

6.3.3	Quality attributes	55
6.3.4	Fermentation metabolites	57
6.3.5	Statistical Analysis	58
6.4	Results and Discussion	58
6.4.1	Quality attributes	58
6.4.2	Fermentation metabolites	63
6.5	Conclusions	64
6.6	References	64
7.	Nota Corta. Volátiles de nopal verdura conservado en atmósferas modificadas	70
7.1	Resumen	70
7.2	Highlights	71
7.3	Introducción	71
7.4	Materiales y Métodos	73
7.4.1	Material Biológico	73
7.4.2	Aplicación de tratamientos y diseño experimental	73
7.4.3	Análisis de compuestos volátiles	73
7.5	Resultados y discusión	74
7.6	Conclusiones	77
7.7	Referencias	77
8.	Artículo 3. Efecto del envasado en atmósferas modificadas en el perfil sensorial del aroma y en la actividad de alcohol deshidrogenasa en dos variedades de nopal verdura	80
8.1	Resumen	80
8.2	Introducción	80
8.3	Materiales y Métodos	84
8.3.1	Material Biológico	84
8.3.2	Aplicación de tratamientos y diseño experimental	84
8.3.3	Análisis sensorial	85
8.3.3.1	Entrenamiento del panel sensorial	85
8.3.3.2	Evaluación sensorial de muestras de nopal verdura	87
8.3.4	Actividad de Alcohol deshidrogenasa	87

8.3.5	Cuantificación de metabolitos de fermentación	87
8.3.6	Análisis estadístico	88
8.4	Resultados y discusión	89
8.5	Conclusiones	98
8.6	Referencias	99
9.	Conclusiones Generales	106
10.	Recomendaciones y perspectivas	107
11.	Referencias	109



## Lista de Tablas y Figuras

	Página
Tabla 1 Atributos de calidad de nopal 'Milpa Alta' almacenado en envases tipo clamshell (con espinas a 23 y 4 °C, y sin espinas 4°C) y en EAM (aire, 5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> ). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.	35
Table 2 Quality attributes of nopal 'Atlixco' stored in clamshell packages (with spines at 23 ± 1 °C and 4 ±1 °C and without spines at 4°C) and MAPs (air, 5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub> and N <sub>2</sub> ). Values are the average of three repetitions ± its standard deviation.	60
Tabla 3 Principales compuestos identificados en el nopal verdura variedad Milpa Alta envasado en atmósferas modificadas y almacenado a 4 ± 1 °C.	75
Figura 1 Escala para evaluar el porcentaje de área afectada con oscurecimiento de nopales almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAMs.	32
Figura 2 Pérdida de peso en nopales almacenados a 4 y 23 °C. A – Nopales 'Milpa Alta' sin espinas a 4 °C en EAM; B – Nopales 'Milpa Alta' en envases tipo clamshell y EAM. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.	37
Figura 3 Índice de oscurecimiento en nopales 'Milpa Alta' almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAM. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.	39
Figura 4 Niveles de acetaldehído (A) y etanol (B) en nopales 'Milpa Alta' sin espinas almacenados a 4 °C en EAM. La barra con líneas cruzadas en A indica la concentración inicial. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.	41
Figura 5 Niveles de acetaldehído (A) y etanol (B) en nopales 'Milpa Alta' con y sin espinas almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAM. La barra con líneas cruzada en A indica la concentración inicial. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.	43
Figure 6 Scale of damage to evaluate the percentage of area affected by pitting in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs.	57

- Figure 7 Weight loss in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C and 23 °C in clamshell packages and MAPs; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation. 61
- Figure 8 Pitting index in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation. 62
- Figure 9 Acetaldehyde levels in cactus stems 'Atlixco' without spines stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs. The empty bar shows the initial value; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation. 63
- Figura 10 Cambios en el perfil sensorial de nopales variedad Milpa Alta en una atmósfera de Nitrógeno a 4°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de almacenamiento. En cada eje se grafica el valor promedio de intensidad de cada nota aromática percibida por los jueces. El símbolo (\*) denota las diferencias significativas en los valores de intensidad. Descriptores: hierba dulce-acetaldehído; alcohol-etanol; manzana verde-hexanal. 91
- Figura 11 Cambios en el perfil sensorial de nopales variedad Atlixco en una atmósfera de Nitrógeno a 4°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de almacenamiento. En cada eje se grafica el valor promedio de intensidad de cada nota aromática percibida por los jueces. El símbolo (\*) denota diferencias significativas en los valores de intensidad. Descriptores: hierba dulce-acetaldehído; alcohol-etanol; manzana verde-hexanal. 93
- Figura 12 Metabolitos de fermentación en nopales almacenados a 4 °C en EAM de Nitrógeno evaluados junto con el perfil sensorial de cada variedad. Variedades Milpa Alta (A) y Atlixco (B). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar. 94
- Figura 13 Actividad de la enzima ADH en nopal variedad Milpa Alta almacenado en EAM a 4 °C (A). Y metabolitos de fermentación en los mismos nopales conservados en aire (B) y nitrógeno (C). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar. 96

Figura 14 Actividad de la enzima ADH en nopal variedad Atlixco almacenado en EAM a 4 °C. (A). Y metabolitos de fermentación en los mismos nopales conservados en: aire (B) y nitrógeno (C). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

## RESUMEN

Con el propósito de alargar la vida útil del nopal verdura desespinado y ponerlo a disposición de los consumidores en una presentación de tamaño adecuado, se estudió el efecto del envasado en atmósferas modificadas (EAM) en la conservación de la calidad de dos variedades comerciales de nopal verdura. Se realizaron cuatro experimentos en las temporadas de producción otoño y verano del 2009 y verano del 2010, para los cuales se colectó nopal verdura (*Opuntia ficus indica* L.) variedad Milpa Alta de plantaciones comerciales sometidas a cultivo tradicional ubicadas en Milpa Alta, México D.F (19°13'25" N; 99°01'47" O) y nopal orgánico variedad Atlixco cultivado en sistema de producción orgánico en Otumba, Estado de México (19° 69'31" N; 98° 76'58" O). Los cladodios se cosecharon manualmente por la mañana (6-7 a.m.) y se transportaron en rejas plásticas al laboratorio, en donde se seleccionaron por tamaño (20-25 cm de longitud), uniformidad de color y ausencia de defectos de acuerdo a la norma oficial de calidad (CODEX STAN 185, 1993), se desinfectaron con una solución de 200 ppm de cloro activo, se aleatorizaron y posteriormente se desespinaron y reborderaron. Los cladodios así acondicionados, se colocaron en bolsas fabricadas con una película polysweat (Bolco D.F., México) permeable al O<sub>2</sub>, al CO<sub>2</sub> y al vapor de agua (260.6 g O<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h / 37.8 °C y 90% de H.R.; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24h a una atmósfera, 23 °C y 0% H.R.) de 35 micras de espesor. Los envases fueron primero sometidos a vacío utilizando una máquina empacadora TURBOVAC 420 ST (Países Bajos) el cual se liberó después con la aplicación de tres atmósferas (aire, mezcla de 5kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> y nitrógeno) o sólo dos (aire y nitrógeno), dependiendo del experimento. Los envases se sellaron y almacenaron a 4 ± 1 °C. Los tratamientos control fueron nopales colocados en envases clamshell almacenados a la misma temperatura. Inmediatamente después de la cosecha y a intervalos regulares durante el almacenamiento se midieron, dependiendo del experimento, atributos de calidad, metabolitos de fermentación, volátiles asociados al aroma del nopal, actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y se determinaron los perfiles sensoriales de olor.

Los resultados indicaron que no hubo un efecto negativo del EAM en los atributos de calidad en ninguna de las dos variedades estudiadas, pero se observaron diferencias en comportamiento durante el almacenamiento entre variedades. Los nopales Milpa Alta tuvieron una reducción significativa de acidez titulable (AT), mientras que la firmeza y el color

no tuvieron cambios significativos. En los nopales de la variedad Atlixco se observó un color verde más intenso, una leve reducción en la acidez mientras que la firmeza se mantuvo también estable durante el almacenamiento.

El EAM redujo notablemente la pérdida de peso debida a transpiración en las dos variedades. En los nopales control de la variedad Milpa Alta se registraron pérdidas del 6-8% y en los conservados en EAMs del 0.2 al 0.8% a los 20 días de almacenamiento, en los nopales Atlixco se observaron reducciones similares de pérdida de peso a los 15 días de almacenamiento por efecto del EAM.

El daño en los tejidos como respuesta a las heridas ocasionadas por el desespinado y rebordeado y a la baja temperatura también fue diferente entre variedades encontrándose que en los nopales 'Milpa Alta' se presentó un oscurecimiento de las zonas desespinaadas probablemente debido a oxidación enzimática o a la reparación de tejidos, mientras que en 'Atlixco' apareció picado e hidrosis como respuesta al daño por frío. El uso de las EAM permitió retrasar la aparición de estos síntomas por 15 días en 'Atlixco' y hasta por 20 días en 'Milpa Alta'.

La producción de metabolitos de fermentación estuvo relacionada con la temporada de corte y las prácticas agrícolas, ya que las concentraciones de estos compuestos variaron en todos los experimentos, además de que se observó una respuesta diferente entre variedades y por efecto de la EAM, encontrándose las menores concentraciones de acetaldehído y etanol en la variedad Atlixco bajo una atmósfera de nitrógeno.

No se observó un efecto de las EAM en el perfil de olor de las dos variedades, pero el tiempo de almacenamiento afectó la forma del perfil y la intensidad para los descriptores evaluados. En los nopales 'Atlixco' se obtuvieron valores de intensidad de los descriptores evaluados más bajos y la forma del perfil fue más parecida a la de la muestra fresca durante

todo el periodo de almacenamiento. No se observó efecto de las EAM en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) pero en la variedad Atlixco se presentaron ligeros aumentos en la actividad de esta enzima los cuales permitieron explicar la desaparición del acetaldehído de los tejidos por la ruta de la fermentación etanólica.

Respecto a los volátiles asociados con el aroma, en la variedad Milpa Alta se identificaron 84 compuestos, 21 de los cuales fueron los más frecuentes. Tres aldehídos se asociaron con notas herbáceas y el 2-nonenol con el aroma típico de la tuna. Los nopales en EAM produjeron volátiles con notas herbáceas y también nuevos volátiles.

Se concluyó que la variedad Atlixco mostró un mejor comportamiento que la variedad Milpa alta en el EAM a 4 °C con atmósfera de nitrógeno pues no presentó oscurecimiento de las zonas desespínadas, produjo concentraciones más bajas de acetaldehído y etanol en el almacenamiento, y no generó olores indeseables, aunque el aroma típico a nopal se puede estar perdiendo como lo indicaron los valores bajos de intensidad en el descriptor manzana verde (hexanal) de los perfiles de olor determinados.

## ABSTRACT

The effect of modified atmosphere packaging (MAP) to preserve the quality of two commercial varieties of edible cacti stems was studied, in order to prolong the shelf life of these thorn-less cacti stems and make them available for consumers in an adequate size presentation. Four experiments were performed during the Summer and Fall production seasons of 2009 and 2010 for which cacti stems (*Opuntia ficus indica* L.) of the Milpa Alta variety were collected. The cacti stems came from commercial plantations in Milpa Alta, Mexico D.F. (19°13'25" N; 99°01'47" O), and were cultivated using traditional methods. Organically grown cacti stems of the Atlixco variety coming from Otumba, Estado de Mexico (19° 69'31" N; 98° 76'58" O). The cacti stems were manually harvested in the morning between 6-7 a.m. and transported in plastic boxes to the laboratory, where they were selected by size (20-25 cm in length), their uniform color, and absence of defects according to an official quality assurance regulation (CODEX STAN 185, 1993). They were then disinfected in a 200 ppm active chlorine solution, randomly distributed, subsequently their thorns were removed and their borders cut. Once the individual stems were thus conditioned, they were placed in 35µm-thick polysweat film bags (Bolco, D.F., Mexico) that were permeable to O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and water vapor (260.6 g O<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h / 37.8 °C and 90% R.H.; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24h in an atmosphere, at 23°C and 0% RH). The containers first underwent a vacuum using the TURBOVAC 240 (Netherlands), an equipment used for packaging. This vacuum was removed with the application of three modified atmospheres (air, a 5kPa CO<sub>2</sub> + 4kPa CO<sub>2</sub> mixture, and nitrogen) or only two (air and nitrogen) depending on the experiment. The containers were then sealed and stored at 4 ± 1°C. Cacti stems placed in clamshells and stored at the same temperature served as controls. Measurements of quality attributes, fermentative metabolites, volatiles associated with the aroma of cacti stems, and alcohol dehydrogenase (ADH) activity were taken immediately after harvest and at regular intervals during storage, as well as odor sensory profiles.

Results indicated that there were no negative effects from the MAP on the quality attributes of either of the two varieties in this study; however, differences in behavior were observed during storage among both varieties. The titratable acidity (TA) of the Milpa Alta variety was significantly reduced, while its firmness and color did not change significantly.

Meanwhile, the green color of the Atlixco variety was more intense, and its acidity decreased slightly while its firmness was maintained stably during storage.

The MAP notably reduced weight loss due to transpiration in both varieties. In the Milpa Alta controls a weight loss of 6-8% was observed compared to the Milpa Alta stems preserved with the MAP, which exhibited a 0.2-0.8% weight loss during 20 days of storage. The Atlixco variety exhibited a similar percent weight loss after 15 days of storage due to the effect of the MAP.

Tissue damage, resulting from injuries caused to the cacti stems due to the removal of the thorns, the borders cut operation, and low temperatures, was different amongst both varieties. The Milpa Alta cacti stems showed browning in the areas where the thorns had been removed, which was probably due to enzymatic oxidation or the damage repair process of tissues. The Atlixco variety showed pitting and hydrosis, as a result of cold damage. The use of the MAP delayed the appearance of these symptoms for up to 15 days for the Atlixco variety and for up to 20 days for the Milpa Alta.

The concentration of fermentative metabolites varied for all experiments, and a different response was noted between the two varieties and also due to the effect of the MAP. The lowest acetaldehyde and ethanol concentrations were found for the Atlixco cultivar, when the variety was placed in a nitrogen atmosphere. Thus, the evidence shows that the production of fermentative metabolites was associated with the harvesting season and the agricultural practices followed.

The MAP had no effect on the odor profile of both varieties, but the storage time did affect this profile, as well as its intensity according to the sensory assessors. The Atlixco stems were given the lowest intensity scores and its profile was concluded to be similar to that of the fresh samples during the entire storage period according the assessors. No effects



on the enzymatic activity of alcohol dehydrogenase (ADH) were observed due to the MAP. However, the Atlixco cultivar showed slight increases in the activity of this enzyme, which explain the disappearance of the acetaldehyde from tissues via the ethanol fermentation pathway.

In regards to the volatiles associated with the aroma, 84 compounds were found in the Milpa Alta variety, of which 21 were the most frequent. Three aldehydes were associated with herbaceous notes, and the 2-nonenol was associated with the typical odor of cacti stems. The stems kept in MAP produced volatiles with herbaceous notes, and also new volatiles.

In conclusion, the Atlixco variety behaved better than the Milpa Alta under the MAP at 4°C with a nitrogen atmosphere, since it did not show any browning around the areas where thorns had been removed, produced the lowest acetaldehyde and alcohol concentrations during storage, and did not generated any undesirable odors; even though the typical cacti stem aroma may be getting lost, as indicated by the low intensity values under the green apple descriptor, *i.e.* hexanal, under determined odor profiles.

## 1. INTRODUCCIÓN

El nopal es miembro de la familia *Cactaceae*, género *Opuntia*. Este género es endémico de América y más de 377 especies han sido reconocidas, 104 crecen en zonas áridas de México y 60 son endémicas del país. En México existe una tradición en el cultivo y utilización de nopal, su consumo se encuentra bien arraigado debido a su sabor típico de un gusto ácido y notas herbáceas, bajo costo y propiedades nutricionales y funcionales, capacidad antioxidante, efectos diuréticos, anti-inflamatorios, anti-hiperlipidémicos, hipoglicémicos y antidiabéticos, entre otros (Stinzing y Carle, 2005). Además de ser utilizado como fuente alimenticia y medicinal, se le han dado otros usos los cuales le confieren un valor adicional ya que sirve como cerco para delimitar propiedades, de base para cosméticos, ayuda en la conservación de suelos, es utilizado como fuente de energía, como sustrato para la grana cochinilla, como forraje para ganado, se consumen sus frutos, y recientemente se ha incursionado en el sector de la construcción y la agroindustria. Debido a su riqueza en sustancias nutraceuticas, diversidad de usos y gran capacidad para crecer en regiones con poca disponibilidad de agua el nopal ha captado la atención de investigadores tanto en diversas partes del mundo como en México (Stinzing y Carle, 2005; Hernández-Zaragoza et al., 2007).

Gran parte de las especies de nopal, silvestres o cultivadas, son aptas para el consumo como verdura fresca, entre las variedades utilizadas en el cultivo para verdura están la criolla, Tlaconopal, Nopalea y como variedades de excelente calidad están Atlixco, Copena V1 y Milpa Alta (INE, 2007). De los 32 estados de la república, 26 de estos contienen superficies sembradas con nopal verdura los cuales en 2010, arrojaron una producción de alrededor de 723,815 toneladas con un valor en miles de pesos de 1, 671,212. En la región centro sur, Distrito Federal, Morelos y Estado de México, se concentra la mayor producción de esta verdura la cual corresponde al 87 % del volumen total, seguido por Baja California (3.7 %), Jalisco (1.9 %) y Puebla (1.5 %) (SIAP, 2010).

Una vez cosechado, la comercialización del nopal inicia a pie de huerta, donde el producto se entrega a mayoristas para que estos lo distribuyan a los diferentes mercados y

finalmente al consumidor. Los principales mercados de nopal verdura en el país son Ciudad de México, Guadalajara, Monterrey, Puebla, San Luis Potosí, Cuernavaca, Torreón, Morelia y Guanajuato (INE, 2007). En el extranjero, los principales puntos de venta son mercados próximos a comunidades latinas en Estados Unidos (como McAllen en Texas), Canadá, Alemania, China y Japón donde el nopal se ofrece procesado en forma de salmuera o escabeche (Pérez-Cacho et al., 2006). Los puntos de venta en la mayoría de las ocasiones están alejados de los sitios de cultivo por lo que ofertar un producto en muy buenas condiciones de calidad se convierte en un reto a vencer. Para su comercialización el nopal es desespinado y rebordeado antes de ser entregado al consumidor lo que se conoce como procesamiento mínimo (Corrales, 1996) y se recomienda su conservación a temperaturas inferiores a 5 °C (Cantwell, 1995). Sin embargo temperaturas inferiores a 10 °C causan daño por frío en los nopales, el cual se manifiesta por encafecimiento y pérdida del color verde original (Ramayo et al., 1978; Nerd et al., 1997). Estos daños se vuelven más críticos cuando el nopal se comercializa lejos de la zona de producción. La presencia de estos síntomas así como el incremento en la firmeza debido a la pérdida de agua, el oscurecimiento de las zonas desespinaadas y la producción de sabores y olores desagradables hacen que el producto sea rechazado por el consumidor (Rodríguez-Félix y Cantwell, 1998; Corrales-García y Flores-Valdez, 2003). La demanda en los mercados domésticos y de exportación puede crecer en el corto plazo si se oferta un producto que atienda las necesidades del consumidor y conserve su frescura, aroma y sabor típico, además de su valor funcional. En este sentido, el nopal verdura desespinado y conservado en envases con atmósfera modificada de tamaño adecuado para el consumidor constituye un nicho de mercado que todavía no ha sido explotado, además de darle al producto un valor agregado que pueda contribuir a reducir las pérdidas estimadas conservadoramente en 15 millones de pesos anuales, debidas a la falta de mercado y la caída de precios hasta límites de incosteabilidad en los meses de mayo a octubre (Callejas- Juárez et al., 2009).

Durante los últimos 50 años el uso de atmósferas controladas (AC) y atmósferas modificadas (AM) para complementar la refrigeración ha tenido un incremento constante y ha contribuido significativamente a extender la vida postcosecha y mantener la calidad de varias frutas y hortalizas (Kader, 1995, Sandhya, 2010). Entre las ventajas de este tipo de tecnología está el retrasar la maduración y senescencia, reducir la respiración, disminuir la

producción de etileno, retrasar el ablandamiento, reducir la deshidratación ocasionada por transpiración (Zagory y Kader, 1988) y si estas atmósferas son ricas en CO<sub>2</sub> permiten además conservar el color verde y la textura original del producto fresco ya que inhiben la acción de diversas enzimas (Kader, 1986; Stinzinger and Carle, 2005). Otros efectos benéficos de EAM son la reducción a la susceptibilidad de patógenos y la disminución en la severidad e incidencia de pudriciones (Zagory y Kader, 1988; Kader, 2002). El uso de EAM ha conseguido prolongar la vida de almacenamiento en diferentes productos vegetales conservando las características de calidad y aroma del producto fresco, sin embargo como respuesta a estas condiciones de estrés los tejidos vegetales incrementan la actividad de enzimas como la alcohol deshidrogenasa (ADH), la ruta de la fermentación etanólica (Kato-Noguchi and Yasuda, 2007) y la acumulación de acetaldehído y etanol en productos como manzanas, peras, naranjas, uvas, fresa, zanahoria y camote (Ke et al., 1994).

En condiciones normales de metabolismo respiratorio, la acumulación de ATP reduce la velocidad de la glicólisis, mientras que en tejidos sujetos a estrés (como baja o alta temperatura, bajos niveles de oxígeno, etc.) la velocidad de este proceso aumenta, aun cuando los niveles de ATP son elevados, teniendo como resultado la acumulación del piruvato. Existen 3 rutas para metabolizar el piruvato acumulado, la ruta que opera en el metabolismo aeróbico que lleva a la transformación a acetil CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa con participación posterior del ciclo de Krebs y cadena respiratoria. La segunda ruta de metabolismo sería la transformación del piruvato a alanina por la acción de la alanina aminotransferasa; este aminoácido se acumula en tejidos sensibles al daño por frío, pero no en los tejidos resistentes a esta fisiopatía. La tercera ruta incluye la transformación del piruvato a acetaldehído por la acción de la piruvato descarboxilasa y su reducción a etanol por la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH), esta última ruta asegura la continuidad de la glicólisis, debido a que permite la oxidación del NADH, proveniente de este proceso (Purvis, 2004).

En el presente trabajo se evaluó el efecto del envasado en diferentes atmósferas modificadas en la calidad y capacidad de conservación en las dos variedades más

comerciales en México de nopal verdura. Los resultados obtenidos se detallan en cuatro documentos científicos, los cuales se describen a continuación:

El primer artículo titulado “Conservación de nopal verdura ‘Milpa Alta’ (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósferas modificadas” fue publicado en la **Revista Mexicana de Ingeniería Química** Vol. 10 No. 1 de Abril de 2011. En este estudio se evaluó el efecto del envasado con atmósferas modificadas en los atributos de calidad y la producción de metabolitos de fermentación de nopal Milpa Alta desespinado.

El segundo artículo con el título “Conservation of fresh organic cactus stems (*Opuntia ficus indica* Mill.) cv. Atlixco in modified atmospheres” se envió para su publicación a la revista **HortScience** y actualmente se encuentra en revisión. El objetivo de este trabajo fue encontrar las mejores condiciones para conservar las características de calidad de esta variedad de nopal utilizando EAM para que al final del almacenamiento se logre un producto con características similares al nopal recién cosechado.

Se redactó una nota corta con el título “Volátiles del aroma de nopal verdura conservado en atmósferas modificadas” que será enviado a la revista **Postharvest Biology and Technology**. En esta nota se describe la producción de algunos compuestos relacionados con el aroma en nopal de la variedad Milpa Alta tanto fresco como envasado en atmósfera modificada.

Finalmente, se escribió un tercer artículo titulado “Efecto del envasado en atmósferas modificadas en el perfil sensorial del aroma y en la actividad de alcohol deshidrogenasa en dos variedades de nopal verdura”, el cual está siendo revisado por el Comité Tutorial para ser enviado a una revista indexada. El propósito de este trabajo fue determinar si los volátiles producidos en la ruta de la fermentación inducida por las condiciones de estrés afectan el perfil de olor de las variedades Atlixco y Milpa Alta de nopal verdura con el fin de conocer que variedad conserva mejor el perfil original de olor y por lo tanto, resulta más adecuada para su conservación en EAM. Asimismo, se estudió el efecto de la baja temperatura, EAM y

heridas causadas por el desespinado en la actividad de la enzima ADH con el objetivo de determinar el posible mecanismo mediante el cual está afectado el metabolismo de nopal verdura en respuesta a estas condiciones de estrés.

Los tres artículos mencionados y la nota técnica se insertan en este orden en la presente tesis después de los objetivos e hipótesis que se mencionan a continuación.

## 2. OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar la producción de metabolitos de fermentación y compuestos asociados al aroma en respuesta a la baja temperatura, heridas por las operaciones de desespinado/rebordeado y el envasado con atmósferas modificadas (EAM) en las variedades comerciales de nopal verdura Milpa Alta y Atlixco para determinar cual de ellas conserva mejor los atributos de calidad y ofrece una mejor respuesta al uso del EAM.
- Estudiar las causas bioquímicas de las diferentes respuestas en producción de metabolitos de fermentación de las variedades de nopal verdura al uso del EAM, mediante la determinación de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH).

### 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar que variedad de nopal verdura conserva un nivel bajo de metabolitos de fermentación en los diferentes EAM evaluados y bajo las diferentes condiciones de estrés.
- Identificar algunos volátiles responsables del aroma en nopales de la variedad Milpa Alta frescos y envasados en atmósferas modificadas.
- Determinar si existe un efecto de las diferentes condiciones de estrés en los volátiles típicos del aroma de nopal verdura en la variedad Milpa Alta.
- Determinar si los volátiles asociados a un proceso metabólico de fermentación debido a las condiciones de estrés provocadas por el daño mecánico del desespinado, la baja temperatura y la atmósfera modificada modifican el perfil de olor de las variedades de nopal Milpa Alta y Atlixco durante el almacenamiento.



#### 4. HIPÓTESIS

- Las diversas condiciones de estrés afectarán de forma diferente a cada variedad.
- La producción de metabolitos de fermentación en la misma variedad será diferente por la influencia de los diferentes EAM, por la temperatura y por las heridas ocasionadas por el desespinado y rebordeado.
- La producción de compuestos del olor se verá modificada por las diferentes condiciones de estrés como la baja temperatura, las heridas y el uso de EAM.
- Las diferentes condiciones de estrés como la baja temperatura, las heridas ocasionadas por el desespinado rebordeado y el uso del EAM afectarán el perfil de olor típico del nopal verdura.
- La actividad de la enzima ADH en cada variedad guardará relación con la producción observada de los metabolitos de fermentación.

## **5. Artículo 1 Conservación de nopal verdura ‘Milpa Alta’ (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada**

Juliana Osorio-Córdoba<sup>1</sup>, Clara Pelayo-Zaldívar<sup>1\*</sup>, José R. Verde-Calvo<sup>1</sup>, Mónica Ponce-Valadez<sup>2</sup>, Fernando Díaz de León-Sánchez<sup>2</sup>, Elsa Bosquez-Molina<sup>1</sup>, Eva Rodríguez-Huezo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, México D.F. CP 09340, México.

Palabras clave: calidad, herida, refrigeración, acetaldehído, etanol, cladodios, Milpa Alta.

Key words: quality, wounding, refrigeration, acetaldehyde, ethanol, cladodes, cactus stems, Milpa Alta.

### **5.1 Resumen**

Se estudió el efecto del envasado con atmósferas modificadas (EAMs) a 4 °C en la calidad del nopal desespinado variedad Milpa Alta. Se aplicaron atmósferas conteniendo aire, 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> y nitrógeno, evaluándose los atributos de calidad y la producción de metabolitos de fermentación durante el almacenamiento. Los resultados indicaron que los nopales tuvieron una reducción significativa de acidez titulable (AT), mientras que la firmeza y el color no tuvieron cambios significativos durante el almacenamiento. La pérdida de peso debido a la transpiración fue mayor en los nopales control (6-8%) que en los conservados en EAMs (0.2-0.8%). Todos los nopales presentaron oscurecimiento de las zonas desespinaadas pero el EAM retrasó su aparición y redujo su intensidad. En los nopales en EAM también se encontró un incremento en la producción de acetaldehído y etanol. El EAM con N<sub>2</sub> indujo los niveles más bajos de estos metabolitos y conservó una mejor calidad de los nopales ‘Milpa Alta’ hasta por 20 días.

## 5.2 Abstract

The effect of modified atmosphere packaging (MAP) at 4 °C on the storage life of 'Milpa Alta' cactus stems without spines was studied. Atmospheres containing air, 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> and Nitrogen were applied. Quality attributes and the production of fermentation metabolites were evaluated during the storage. Results indicated that 'Milpa Alta' cactus stems had a significant reduction in titratable acidity (TA), but not significant changes were found in firmness and color values in cactus stems during storage. The weight loss was higher in control (6-8 %) than in MAPs stored cactus stems (0.1 to 0.8 %). Control and treated cladodes showed browning symptoms on areas where spines were removed, but MAPs delay the time when they appeared and the damage intensity. Also, cactus stems kept in MAPs showed an increase in acetaldehyde and ethanol production. The MAP with nitrogen induced the lowest levels of fermentation metabolites and preserved the quality of Milpa Alta cactus stems up to 20 days in storage.

## 5.3 Introducción

Los nopales (*Opuntia* spp.) también conocidos como nopal verdura o nopalitas, son consumidos tradicionalmente en México, pero actualmente son demandados por algunas comunidades de los Estados Unidos, Canadá, Japón, Italia y Turquía debido a su bajo valor calórico, alto contenido en fibra y cualidades nutricionales y funcionales (Stintzing y Carle, 2005; Sáenz, 2004). México cuenta con un gran número de especies de nopal, siendo *O. ficus-indica* la más explotada comercialmente, otras especies como *O. streptacantha* Lemaire, *O. lindhemeiri* Engel, *O. amyclaea* Tenore, *O. megacantha* Salm-Dick y *O. robusta* Wendland son importantes como forraje o por su producción de fruta (tuna) (Rodríguez-Felix, 2002). Dentro de *O. ficus-indica* se encuentran la variedad de nopal verdura Milpa Alta que es una de las más importantes en México por los volúmenes producidos y consumidos (SIAP, 2009).

Los nopales en los primeros estadios de desarrollo presentan un metabolismo C3, el cual cambia al metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en estados avanzados de desarrollo (Cantwell y col., 1992; Rodríguez, 2009). Los nopales que exhiben el metabolismo CAM presentan cambios en el contenido de ácido málico durante el día, con valores altos en

la mañana y más bajos en la tarde, debido a que este ácido se acumula de noche en las vacuolas y en presencia de luz difunde pasivamente de la vacuola al citoplasma, donde es descarboxilado por la enzima málica dependiente de NADP<sup>+</sup> y el CO<sub>2</sub> así producido ingresa al ciclo de Calvin para la síntesis de carbohidratos (Rodríguez-Félix y Villegas Ochoa, 1998; Corrales-García y Flores-Valdez, 2003; Taiz y Zeiger, 2006). Esto ocasiona que la acidez del nopal fluctúe en el día afectando el sabor, por lo que la cosecha se realiza de 5:00 a 7:00 de la mañana. El corte se efectúa siguiendo el índice propuesto por Rodríguez-Felix y Cantwell (1988) basado en la longitud del cladodio (aproximadamente 20 cm) y número de días de emergencia del brote (35 días) (CODEX STAN 185, 1993). Después de cosechados los nopales, se colocan en canastos, rejas de plástico o se arreglan en forma de pacas cilíndricas para transportarlos al centro de acopio o al mercado de destino; previo a la comercialización se eliminan las espinas junto con pequeñas porciones de tejido y se efectúa el recorte de todo el borde (rebordeado) del cladodio para darle forma. Los nopales así acondicionados deben venderse en menos de tres días para que tengan la calidad adecuada (Rodríguez-Felix y Villegas-Ochoa, 1998).

El daño físico causado durante el procesamiento mínimo del nopal, incrementa procesos metabólicos como la respiración y producción de etileno, la degradación de los lípidos de las membranas, el oscurecimiento oxidativo, la pérdida de firmeza y agua, y la acumulación de metabolitos secundarios, produciendo deterioro y reduciendo la vida de anaquel del producto (Cantwell y *col.*, 1992; Saltveit, 1998). Estos cambios se vuelven más críticos cuando el nopal se comercializa en mercados distantes de la zona de producción. Por lo anterior, después del procesamiento mínimo de los cladodios se recomienda que las superficies cortadas se mantengan limpias y secas, y se almacenen a temperaturas inferiores a 5 °C (Cantwell, 1995), que son las recomendadas para conservar los productos de procesamiento mínimo. Sin embargo, condiciones inferiores a 10 °C causan daño por frío en los nopales, el cual se manifiesta por oscurecimiento y pérdida del color verde original (Ramayo-Ramírez y *col.*, 1978; Nerd y *col.*, 1997). La presencia de los síntomas antes mencionados, así como los cambios en firmeza, el oscurecimiento de las zonas desespinaadas, y la producción de olores y sabores desagradables hacen que el producto sea rechazado por el consumidor (Rodríguez-Félix y Cantwell, 1988; Corrales-García y Flores-Valdez, 2003).

Se han aplicado diversas técnicas postcosecha para tratar de conservar los atributos de calidad del nopal verdura con espina. Cantwel y col. (1992) encontraron que estos nopales envasados en bolsas de polietileno y almacenados a 5 °C prolongaron su vida de anaquel hasta por 3 semanas sin observar desarrollo de algún síntoma visual de daño por frío. Asimismo, Guevara y col. (2001) reportaron que el nopal con espinas almacenado a 5 °C en atmósferas modificadas con niveles inferiores a 8.6 kPa de O<sub>2</sub> y superiores a 6.9 kPa de CO<sub>2</sub>, disminuyeron los síntomas de deterioro de la calidad, mostrando una vida de anaquel de 30 días. También, el uso de una atmósfera pasiva y una activa con 20 kPa de CO<sub>2</sub> redujeron significativamente las pérdidas en fibra, textura, peso y color en nopal con espinas almacenado a 5 °C (Guevara y col., 2003). Sin embargo, los estudios sobre la conservación de nopal sin espinas son limitados y los concernientes al envasado en atmósferas modificadas (EAM) y su efecto en los metabolitos de fermentación son nulos. Nuestro grupo de trabajo encontró que el nopal 'Milpa Alta' sin espinas envasado en atmósfera de N<sub>2</sub> en bolsa polysweat (Bolco, D.F., México) permeable a O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> y almacenado a 7 °C ± 1 °C alargó la vida de anaquel hasta por 20 días, manteniendo su calidad (Robles-Rodríguez y col., 2008).

En condiciones anaeróbicas o bajo la influencia de factores de estrés abiótico como las heridas, baja temperatura, elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas de O<sub>2</sub>, se altera la actividad de diversas rutas metabólicas de las plantas (Kozlowski y Pallardy, 1997). En estas condiciones se puede inducir en los tejidos la fermentación etanólica y por tanto la acumulación de alcohol y acetaldehído (Kato-Noguchi y Yasuda, 2007; Danyang y col., 1994; Kimmerer y MacDonald, 1987).

Debido a la riqueza en compuestos funcionales del nopal, a su diversidad de usos (Stintzing y Carle, 2005; Hernandez-Zaragoza y col., 2007) y a su gran demanda en México y en otros países se busca ofertar un producto que atienda las necesidades del consumidor y conserve su frescura, aroma y sabor típicos. En este sentido, el nopal verdura desespinado y conservado en atmósferas modificadas en envases de tamaño adecuado para el consumidor, constituye un nicho de mercado que todavía no ha sido explotado. El objetivo

del presente trabajo fue evaluar el efecto del envasado con atmósferas modificadas en la conservación del nopal desespinado variedad Milpa Alta determinando parámetros indicadores de las condiciones de estrés provocadas por el daño mecánico del desespinado y la atmósfera modificada.

## **5.4 Materiales y Métodos**

### **5.4.1 Material biológico**

Se colectó nopal verdura (*Opuntia ficus indica* L.) variedad Milpa Alta de plantaciones comerciales ubicadas en Milpa Alta, México, D.F. (19°13'25"N; 99°01'47" O). Los cladodios se cosecharon manualmente por la mañana (6-7 a.m.) y se transportaron en rejas de plástico al laboratorio.

### **5.4.2 Aplicación de tratamientos y diseño experimental**

Los cladodios se seleccionaron por tamaño (20 a 25 cm de longitud), uniformidad de color y ausencia de defectos de acuerdo a la norma oficial de calidad (CODEX STAN 185, 1993), se desinfectaron con una solución de 200 ppm de cloro activo. Los nopales se dividieron aleatoriamente en dos grupos, sólo uno de ellos se desespinoó y rebordeó. Se llevaron a cabo dos experimentos, teniendo como factores de estudio las heridas ocasionadas por el desespinado y rebordeado, y el envasado con diversas atmósferas modificadas.

En el primer experimento, los cladodios sin espinas se colocaron en bolsas para EAM fabricadas con una película polysweat (Bolco, D.F., México) permeable al O<sub>2</sub>, al CO<sub>2</sub> y al vapor de agua (260.6 g O<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h/37.8 °C y 90% de H.R; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24 h a una atmósfera, 23°C y 0% H.R) de 35 micras de espesor. Los envases fueron primero sometidos a vacío utilizando una máquina empacadora Multivac C100 (Alemania), el cual se liberó después con la aplicación de tres atmósferas: 1) aire, 2) nitrógeno y 3) mezcla de 5 kPa O<sub>2</sub> +4 kPa CO<sub>2</sub> complementada con N<sub>2</sub> y se sellaron. Los nopales envasados se almacenaron a 4 °C ± 1°C.

En el segundo experimento se manejaron nopales con y sin espina y dos tipos de envases: clamshell (25.5 largo x 16.5 ancho x 6 cm alto) y las bolsas para EAMs antes citadas. Los nopales con espinas se colocaron en envases clamshell y fueron almacenados a temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), mientras que los cladodios desespinaados se almacenaron en envases clamshell y bolsas para EAMs, manteniéndose a  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . En las bolsas para EAMs se aplicaron nuevamente las atmósferas aire, nitrógeno y mezcla de  $5\text{ kPa O}_2 + 4\text{ kPa CO}_2$ . En todos los experimentos la unidad experimental fue de cuatro nopales y tres repeticiones por tratamiento y el diseño experimental fue completamente al azar. Inmediatamente después de la cosecha y a los 5, 10, 15, 20 y 25 días de almacenamiento se midieron atributos de calidad y metabolitos de fermentación.

#### 5.4.3 Atributos de calidad

Color. El color verde de los nopales se evaluó en 10 discos de 2.3 cm de diámetro de las áreas libres de espinas de cada cladodio mediante un colorímetro HunterLab Modelo ColorFlex® (Hunter Associates Laboratory, EUA). Con los valores obtenidos se calculó el valor  $\Delta E$  (grado de diferencia de color en el tiempo) mediante la ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

En donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$ , y  $b^*$  entre el valor inicial antes del almacenamiento y el de la fecha de muestreo (HunterLab, 2010).

Firmeza. La fuerza necesaria para penetrar 7 mm la base del cladodio se determinó usando un penetrómetro (tr®, Italy) equipado con un punzón de 5 mm de diámetro y los resultados se reportan en Newtons (N) (Reid, 2007).

Acidez titulable (AT). Se midió por titulación ácido-base del jugo de nopal verdura obtenido de cada unidad experimental mediante un extractor de jugos eléctrico, utilizando

hidróxido de sodio 0.1 N como titulante y fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresan como g de ácido málico/100 g de jugo fresco de nopal (AOAC, 2000).

Pérdida de peso. Se utilizó una balanza digital de precisión explorer (OHAUS Corporation® - USA) para medir el peso inicial y las variaciones de peso durante el almacenamiento. Los resultados se expresan en % del peso perdido con respecto al peso inicial (Burton, 1982).

Índice de oscurecimiento. Para evaluar el oscurecimiento de las zonas desespina das de los nopales se elaboró una escala porcentual en función del área afectada, en donde 0 = ausencia de daño (0% de la superficie afectada); 1= ligero (1-10%); 2 = medio (11 – 20%); 3 = moderado (21-50%); y 4 = severo (> 50 %) (Fig. 1). Con los datos obtenidos se obtuvieron los índices de oscurecimiento aplicando la ecuación:

$$\sum_{i=1}^{i=n} = \frac{(1xn_1) + (2xn_2) + (3xn_3) + (4xn_4)}{n}$$

En donde:  $n_1$ = número de nopales en el grado 1, ...  $n_4$ = número de nopales en el grado 4 y  $n$ = número total de nopales.

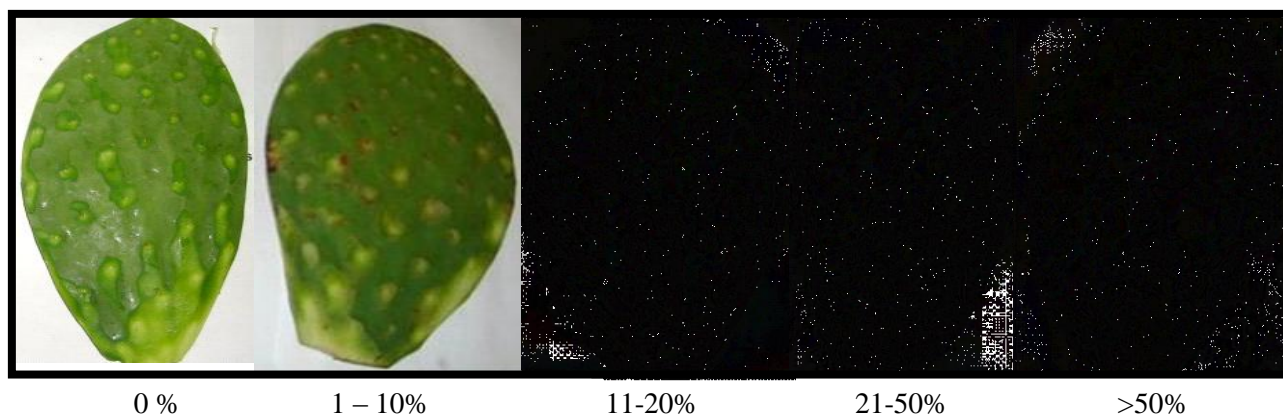


Figura 1. Escala para evaluar el porcentaje de área afectada con oscurecimiento de nopales almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAMs.



#### **5.4.4 Metabolitos de fermentación**

El jugo de nopal de cada unidad experimental, obtenido como se indicó previamente para el análisis de AT, se congeló con nitrógeno líquido y almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para cuantificar las concentraciones de acetaldehído y etanol en las muestras, se tomaron 6 g del jugo de nopal y se colocaron en un vial de vidrio de 30 mL conteniendo 9 mL de agua destilada y 3.6 g de NaCl para favorecer la liberación de los volátiles de la matriz al espacio de cabeza (Harmon, 1997), el vial se cubrió con un septo de vitón negro, se selló con un aro metálico y agitó en un vórtex Thermolyne 16700 mixer por 90 s. Para capturar y concentrar los metabolitos de fermentación del espacio de cabeza se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS), empleando una fibra de sílica de  $75\text{ }\mu$  de espesor recubierta con Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) (Supelco, Bellefonte, CA). La fibra se expuso por 10 min al espacio de cabeza, manteniendo el vial durante este periodo en incubación en un baño de agua a  $34 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La fibra se desorbió en un CG Varian 3900 (Varian, Palo Alto, C.A.) equipado con un detector de ionización de flama, utilizando una columna capilar HP-INNOWAX de 0.32 mm I.D.,  $0.25\text{ }\mu\text{m}$  de espesor y 60 m de longitud (Agilent Technologies, USA). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cual aumentó  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto hasta alcanzar  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  donde permaneció por 6 minutos. Los metabolitos de fermentación se identificaron comparando los tiempos de retención con los de estándares comerciales extraídos, concentrados y analizados con el mismo procedimiento analítico y las concentraciones se calcularon mediante curvas estándar elaboradas con diluciones acuosas de acetaldehído (Aldrich) y etanol ( J.T. Baker).

#### **5.4.5 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XV versión 15.2.14 aplicando ANOVA multifactorial para determinar si había diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las variables analizadas e interacción con los días de almacenamiento. Cuando se detectaron diferencias significativas, se efectuó la comparación múltiple de medias por el método de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). En el caso de pérdida de

peso se eliminó la dependencia de los datos del valor inicial y por tanto se analizaron de forma independiente.

## **5.5 Resultados y Discusión**

Se presentan resultados de los dos experimentos realizados; en el caso de atributos de calidad sólo los del segundo experimento dado que el comportamiento fue similar en ambos.

### **5.5.1 Atributos de calidad**

Durante el almacenamiento, se observó en los cladodios una reducción en la acidez titulable, siendo ésta más notable en los nopales con espina almacenados a temperatura ambiente (Tabla 1). Los EAM no influyeron significativamente en la reducción de la AT de los nopales. De forma similar, Cantwell y *col.* (1992) reportaron una reducción de la acidez en nopales con espina almacenados en refrigeración. Probablemente esta disminución se deba a que el ácido málico en los cladodios almacenados en condiciones de oscuridad se emplea como sustrato respiratorio, siendo utilizado en el ciclo de Krebs para generar ATP (Taiz y Zeiger, 2006). En firmeza no se observó una tendencia clara de cambio durante el almacenamiento y en cuanto al efecto de los tratamientos sólo se encontró que los nopales que se almacenaron a temperatura ambiente y que tenían espinas tuvieron valores significativamente más altos que los que se mantuvieron a 4 °C y en EAM. El aumento en firmeza se explica por la alta pérdida de peso (6-8%) de los tejidos que generó cambios de textura. Este incremento de firmeza no se presentó en los nopales conservados en EAM ya que la humedad relativa alta dentro de los envases evitó una pérdida excesiva de agua y peso en los tejidos manteniendo la frescura del producto. Respecto a la variable de color  $\Delta E$ , no se observaron cambios significativos en los nopales durante los días de almacenamiento y tampoco por efecto de tratamientos (Tabla 1). Guevara y *col.* (2001) reportan que los nopales con espinas almacenados en EAM mantienen su color, mientras que los controles cambian de un color verde brillante a un verde opaco.

Tabla1. Atributos de calidad de nopal 'Milpa Alta' almacenado en envases tipo clamshell (con espinas a 23 y 4 °C, y sin espinas 4°C) y en EAM (aire, 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

Variable	Tratamiento	Días de almacenamiento					
		0	5	10	15	20	25
Acidez titulable (% ácido málico)	Con espinas 23°C	0.82 ± 0.02a*	0.64 ± 0.02a	0.46 ± 0.02a	0.44 ± 0.02 a	0.39 ± 0.02a	-
	Con espinas 4°C	0.82 ± 0.02a	0.81 ± 0.00b	0.68 ± 0.02b	-	-	-
	Sin espinas 4°C	0.82 ± 0.02a	0.79 ± 0.02b	0.67 ± 0.02b	0.55 ± 0.02b	0.43 ± 0.02b	0.42 ± 0.00a
	Aire	0.82 ± 0.02a	0.69 ± 0.02b	0.61 ± 0.02b	0.61 ± 0.02b	0.53 ± 0.02b	0.55 ± 0.02a
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	0.82 ± 0.02a	0.78 ± 0.02b	0.69 ± 0.02b	0.56 ± 0.04b	0.51 ± 0.02b	0.43 ± 0.02a
	N <sub>2</sub>	0.82 ± 0.02a	0.70 ± 0.02b	0.64 ± 0.02b	0.64 ± 0.02b	0.53 ± 0.02b	0.41 ± 0.02a
Firmeza (N)	Con espinas 23°C	30.02 ± 3.93a	35.45 ± 6.16a	35.21 ± 3.61a	38.03 ± 4.79a	35.71 ± 2.02a	-
	Con espinas 4°C	30.02 ± 3.93a	28.41 ± 2.89b	31.39 ± 2.83b	-	-	-
	Sin espinas 4°C	30.02 ± 3.93a	23.43 ± 3.31b	26.69 ± 5.68b	27.60 ± 4.22b	31.75 ± 5.61b	25.56 ± 2.83a
	Aire	30.02 ± 3.93a	28.03 ± 5.38b	23.67 ± 5.27b	26.76 ± 3.68b	28.50 ± 3.61b	29.28 ± 3.81a
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	30.02 ± 3.90a	27.74 ± 3.32b	30.40 ± 2.91b	31.69 ± 3.28b	30.75 ± 5.77b	25.68 ± 2.72a
	N <sub>2</sub>	30.02 ± 3.93a	27.33 ± 4.16b	27.35 ± 4.60b	29.76 ± 4.90b	29.13 ± 3.28b	28.30 ± 2.25a
Color (ΔE)	Con espinas 23°C	0	3.99 ± 2.14a	5.41 ± 1.42a	5.65 ± 1.95a	4.49 ± 1.93a	-
	Con espinas 4°C	0	4.46 ± 2.01a	3.95 ± 1.78a	-	-	-
	Sin espinas 4°C	0	2.01 ± 1.23a	3.38 ± 0.73a	3.23 ± 0.68a	3.37 ± 0.91a	-
	Aire	0	3.26 ± 2.63a	3.16 ± 1.39a	3.78 ± 1.42a	1.96 ± 1.59a	2.64 ± 2.05a
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	0	3.68 ± 1.19a	2.59 ± 1.81a	2.53 ± 1.97a	2.55 ± 1.58a	2.66 ± 1.96a
	N <sub>2</sub>	0	3.81 ± 2.17a	4.19 ± 2.09a	2.43 ± 1.34a	2.53 ± 1.51a	2.87 ± 1.48a

\*Las medias seguidas por la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes (Tukey HSD 95%).

La pérdida de peso (PP) de los nopales 'Milpa Alta' sin espinas conservados en aire, N<sub>2</sub> y 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> fue menor al 1% después de 25 días de almacenamiento (Fig. 2 A, B) y no se registraron diferencias significativas entre tratamientos; en contraste, la PP en los nopales sin espina colocados en envases clamshell a 4 °C fue superior (aproximadamente 10 %) (Fig. 2B). Guevara y *col.* (2003) encontraron que los cladodios con espina envasados en atmósferas pasiva y activa, ésta última con una concentración inicial de 20 kPa de CO<sub>2</sub>, tuvieron menores PPs (≈2 %) que los nopales empacados en cajas de cartón (>25%) a los 25 días de almacenamiento a 5 °C. Los nopales con espina almacenados a 4 °C en envases clamshell, mostraron una PP menor que los cladodios sin espina en este tipo de envase, pero mayor cuando se les almacenó a temperatura ambiente (6- 8% a los 15 días de almacenamiento) (Fig. 2 B). Las pérdidas de peso ocasionan pérdidas económicas importantes por la reducción del peso neto de los envases y los cambios indeseables de calidad (marchitez, arrugamiento, pérdida de brillo) (Wills y *col.*, 1998). Generalmente, los productos que pierden más del 5% de su peso original se ven afectados en su apariencia visual (Kader, 1992).

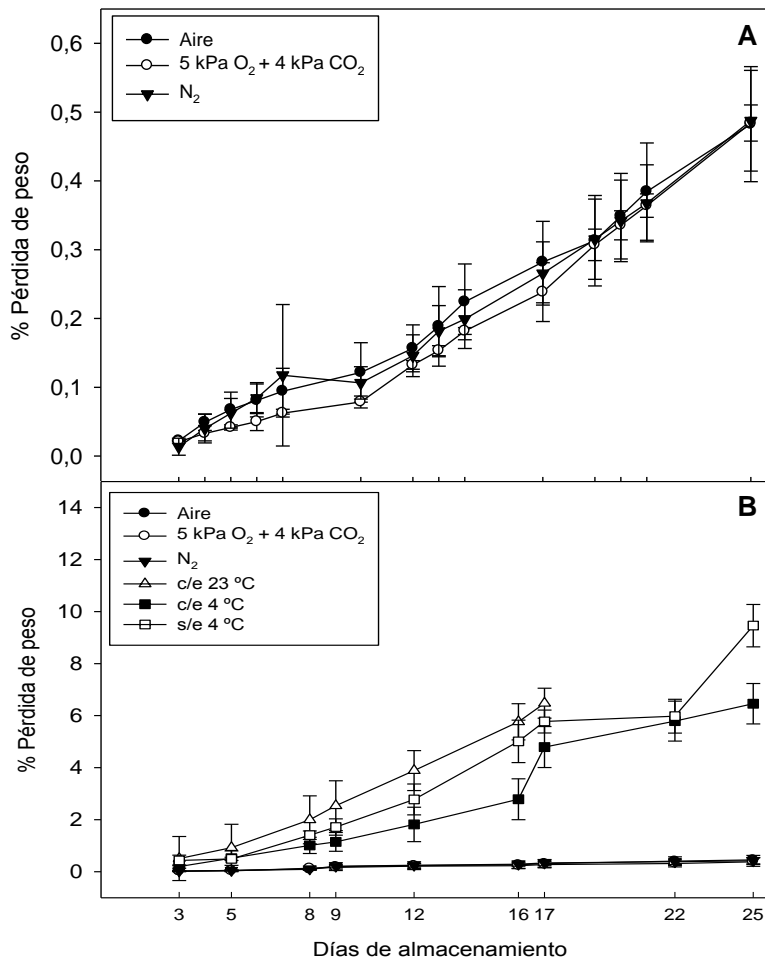


Figura 2. Pérdida de peso en nopales almacenados a 4 y 23 °C. A – Nopales ‘Milpa Alta’ sin espinas a 4 °C en EAM; B – Nopales ‘Milpa Alta’ en envases tipo clamshell y EAM. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

El oscurecimiento que aparece en los tejidos expuestos donde las espinas se eliminaron, empezó a observarse a los 10 días de almacenamiento a 4° C en los nopales en envases clamshell y a los 15 días en todos los nopales en EAM donde el daño fue además menos intenso (Fig. 3). Este resultado es similar al período de conservación encontrado por nuestro grupo de trabajo para nopales envasados en una atmósfera de N<sub>2</sub> a 7 °C ± 1 °C (Robles-Rodríguez y col., 2008) y concuerda con Guevara y col. (2001) quienes reportaron

que el oscurecimiento en las zonas desespínadas del nopal fue más severo en la muestra control que no estuvo en EAM. Asimismo, el menor daño se presentó en los nopales envasados en atmósferas con aire y nitrógeno. Esta fisiopatía no es considerada daño por frío dado que también se observa en los nopales mantenidos a temperatura ambiente, probablemente se trate de un oscurecimiento enzimático tardío pues no aparece inmediatamente después de que los tejidos se han dañado y expuesto al oxígeno como consecuencia de la eliminación de espinas y rebordeado, sino al cabo de 5 a 10 días, dependiendo de la época de cosecha y de la temperatura de almacenamiento, por la protección debida al ácido ascórbico presente en los tejidos que actúa como antioxidante (Quevedo y col., 2005). Una segunda explicación puede ser la presentada por Aquino-Bolaños y Mercado-Silva (2004), quienes señalan que la aparición de áreas de color rojo ocre en tejidos dañados de jícama se debe a la presencia de ligninas o sus intermediarios derivados de la oxidación de monolignoles (componentes de pared celular) que se sintetizan como parte del proceso normal de reparación de tejidos. Probablemente, esta misma explicación se pueda aplicar al nopal pues por una parte, el daño observado en los cladodios coincide más con este color ocre que con el oscurecimiento típico de oxidación enzimática, y por otra esto justificaría su aparición tardía pues primero han de darse mecanismos de detección y transducción de señales de daño físico a nivel celular con la subsiguiente expresión de genes y respuestas bioquímicas que finalicen con la síntesis y acumulación de los lignanos responsables del color observado (Saltveit, 2000). La aparición de oscurecimiento en un área mayor al 11% de la superficie total del nopal afectó adversamente la apariencia visual de los cladodios, por lo cual se asumió que la vida de anaquel se limita con un índice oscurecimiento mayor a 1.0 ( $\geq 11\%$  de la superficie afectada). Estos resultados indican que las atmósferas modificadas retrasan la aparición de la fisiopatía y apoyan los beneficios (reducción en pérdida de peso debido a una menor transpiración y prevención del oscurecimiento propiciado por el oxígeno del aire) reportados por Kader (1992) para esta tecnología de conservación.

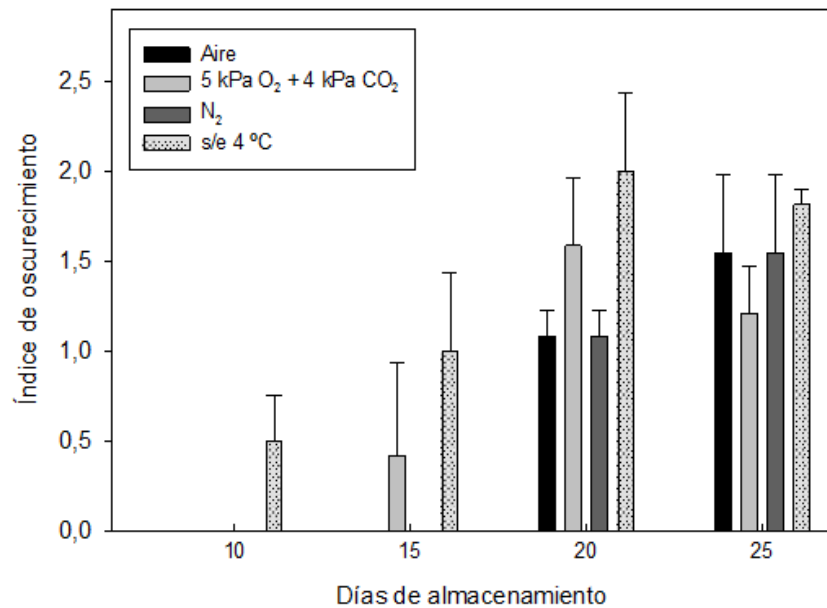


Figura 3. Índice de oscurecimiento en nopales ‘Milpa Alta’ almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAM. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

### 5.5.2 Metabolitos de fermentación

Cuando los nopales Milpa Alta sin espinas fueron almacenados en EAM conteniendo aire, 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> y nitrógeno se observó la producción tanto de acetaldehído como de etanol (Fig. 4 A y B). La concentración de acetaldehído se elevó notablemente a los 5 días y disminuyó gradualmente durante el almacenamiento hasta alcanzar niveles inferiores a 20 ppm a los 25 días (Fig. 4 A); simultáneamente con el descenso en los niveles de acetaldehído, las concentraciones de etanol aumentaron particularmente en los nopales mantenidos en aire (Fig. 4 B); en los nopales almacenados en 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> y nitrógeno las concentraciones de etanol se mantuvieron estables hasta los 15 días para después disminuir al final del almacenamiento (Fig. 4 B). La disminución en los niveles de acetaldehído con la elevación simultánea en la concentración de etanol observada en las tres atmósferas modificadas, indica que en estas condiciones está operando la ruta normal

de la fermentación etanólica, en donde el acetaldehído es convertido a etanol por la acción de la ADH. Aun cuando podría pensarse que esta respuesta es la consecuencia lógica de una inducción de la ruta de fermentación por limitaciones en la concentración de oxígeno, no se podría aseverar de manera contundente ya que existen reportes de que no todos los tejidos vegetales responden de esta manera. La inducción de esta ruta de fermentación no solo ocurre por limitaciones en la disponibilidad de oxígeno sino por otros factores de estrés como las heridas, las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y la senescencia (Kato-Noguchi, 2001; Kürsteiner y *col.*, 2003), además se conoce que el frío también puede ocasionar un estrés fisiológico capaz de inducir el metabolismo de fermentación (Purvis, 1997; Kato-Nagushi y Yasuda, 2007). De igual manera en ocasiones ni el frío ni las elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> provocan incrementos de acetaldehído y etanol en los tejidos (Watkins y *col.*, 2001; Pelayo y *col.*, 2003; Ponce y Watkins, 2008) probablemente debido a que entran en operación rutas metabólicas alternas para disipar las altas cantidades de piruvato que se producen bajo condiciones de estrés, como su conversión en alanina por la acción de la alanina aminotransferasa (Purvis, 1997) o a acetyl CoA por la acción de la piruvato deshidrogenasa (Tadege y *col.*, 1999).



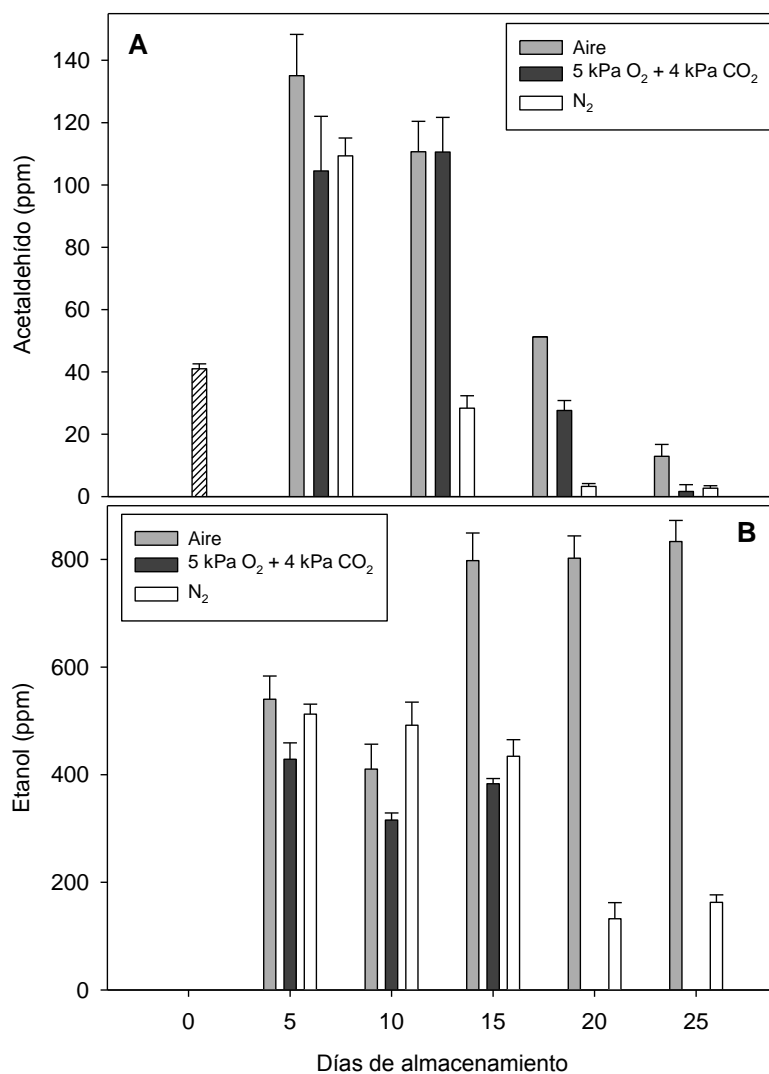


Figura 4. Niveles de acetaldehído (A) y etanol (B) en nopales ‘Milpa Alta’ sin espinas almacenados a 4 °C en EAM. La barra con líneas cruzadas en A indica la concentración inicial. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

Los resultados anteriores fueron corroborados con los obtenidos en el segundo experimento (Fig. 5 A y B). Las concentraciones de acetaldehído se elevaron a los 5 días, excepto en los nopales con espina almacenados a temperatura ambiente (sin estrés por herida, ni estrés por baja temperatura) para después disminuir paulatinamente hasta el final

del almacenamiento (Fig. 5 A). Los cladodios con espinas a 4 °C presentaron mayor concentración de acetaldehído que los almacenados a temperatura ambiente; entre los nopales con espina y sin espina a 4 °C, los segundos mantuvieron niveles altos de este metabolito por más tiempo; y las concentraciones de este compuesto también fueron altas en los nopales almacenados en 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa. Estos resultados sugieren que los nopales perciben el estrés por baja temperatura, el ocasionado por las heridas de la operación de desespinado y el impuesto por las atmósferas modificadas conteniendo aire y 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa, y responden a ellos activando la ruta de fermentación etanólica.

Sin embargo, las concentraciones de etanol fueron más bajas (Fig. 5, 150-250 ppm) que las observadas en el primer experimento (Fig. 4, 100-800 ppm) y probablemente por esta razón el etanol sólo se detectó en los cladodios conservados en la EAM conteniendo aire pues fue la atmósfera modificada que lo indujo en mayor concentración. Las prácticas agrícolas y la fecha de corte son factores adicionales que pudieron estar influyendo en la producción de metabolitos de fermentación por los nopales utilizados en la presente investigación (Pelayo-Zaldívar, 2010) pues los nopales se cosecharon en otoño para el primer experimento y en verano para el segundo, lo que podría explicar estas diferencias en los niveles de etanol.

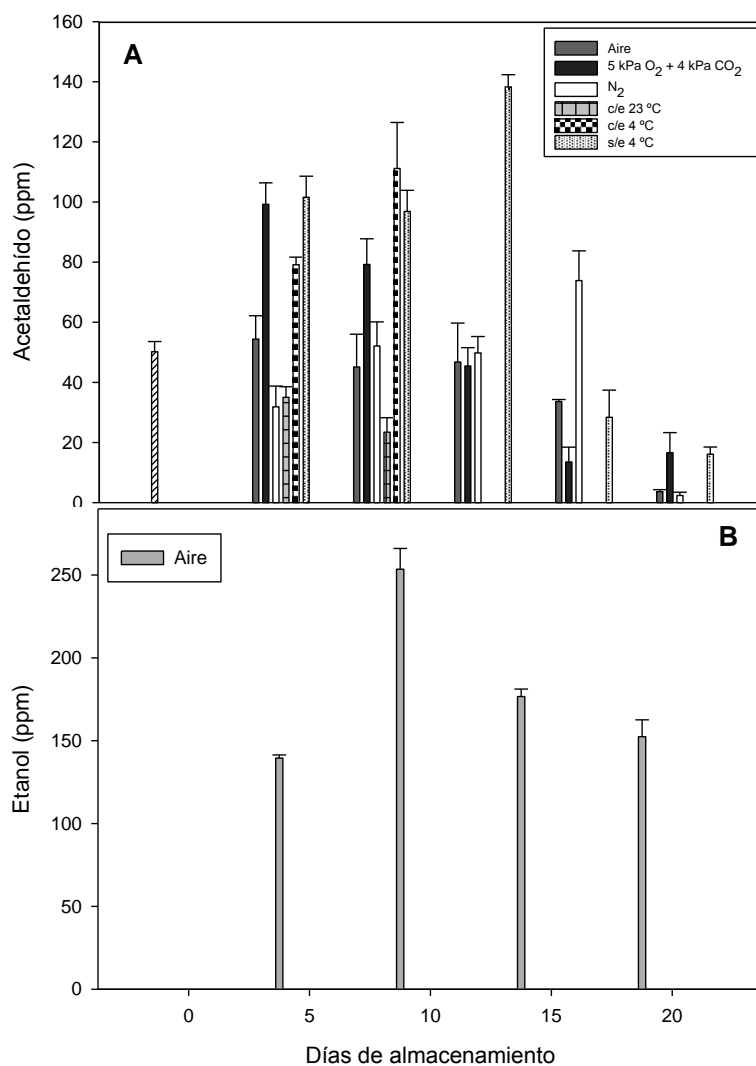


Figura 5. Niveles de acetaldehído (A) y etanol (B) en nopales ‘Milpa Alta’ con y sin espinas almacenados a 4 °C en envases tipo clamshell y EAM. La barra con líneas cruzada en A indica la concentración inicial. Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

Resultaría de interés en un trabajo futuro verificar la operación de la fermentación etanólica y de las rutas alternas de disipación del piruvato, empleando técnicas bioquímicas y de biología molecular, así como efectuar un estudio sensorial del efecto que los niveles encontrados de metabolitos de fermentación tienen en el sabor y el aroma del nopal.

## **5.6 Conclusiones**

La calidad de los nopales 'Milpa Alta' desespinaados conservados sólo en refrigeración a 4 °C se redujo en el almacenamiento debido a que la acidez titulable disminuyó (50% a los 20 días), la pérdida de peso incrementó por la transpiración que normalmente ocurre en los productos vegetales, alcanzando valores del 6% a los 20 días y por el oscurecimiento de las zonas desespinaadas que empezó a observarse a los 10 días de almacenamiento. Cuando los nopales desespinaados se envasaron con atmósferas modificadas conteniendo aire, nitrógeno y una mezcla de 5 kPa O<sub>2</sub> +4 kPa CO<sub>2</sub> la calidad logró conservarse por un período de 20 días a la misma temperatura, debido a que la pérdida de peso fue sólo del 1%, la aparición del oscurecimiento se retrasó en cinco días y su intensidad se redujo, particularmente en las atmósferas conteniendo aire y nitrógeno (de un índice de oscurecimiento de 2.0 a 1.0). No se observaron síntomas de daño por frío a 4 °C, lo cual indica que los nopales de esta variedad son tolerantes a la baja temperatura. El envasado en atmósfera modificada, las heridas ocasionadas por el desespinaado y la baja temperatura del almacenamiento refrigerado indujeron una producción aumentada de metabolitos de fermentación, lo que sugiere que estos tres factores son percibidos como un estrés fisiológico por los tejidos de los nopales 'Milpa Alta'. La atmósfera modificada conteniendo nitrógeno indujo la menor producción de metabolitos de fermentación y, por lo tanto, es la recomendada para conservar la calidad de esta variedad de nopal verdura por un período de 20 días a 4 °C.

## **5.7 Agradecimientos**

La presente investigación fue realizada con el apoyo económico complementario del CONACYT (Proyecto 90610, 2008) y de la UAMI. Agradecemos igualmente al CONACYT la beca otorgada a Juliana Osorio Córdoba para la realización de sus estudios de doctorado.

## 5.8 Referencias

- Aquino-Bolaños, E.N. y Mercado-Silva, E. (2004). Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biol. Technol.* 33, 275-283.
- A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. Gaithersburg, Maryland, EUA.
- Burton, W.G. (1982). Post-harvest physiology of food crops. Editorial Longman, New York, E.U.A. Pp.340.
- Cantwell, M., Rodriguez-Felix, A. y Robles-Contreras, F. (1992). Postharvest physiology of prickly pear cactus. *Scientia Horticulturae* 50, 1-9.
- Cantwell, M. (1995). Post-Harvest management of fruits and vegetable stems. En: Agroecology, cultivation and uses of cactus pear, Paper 132 (Barbera, G., Inglese, P., Pimienta- Barrios, E.), Pp. 120-141. Editorial FAO Plant Production and Protection, Roma.
- CODEX STAN 185 (1993). Norma del CODEX para el nopal. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es). Accesado: 20 septiembre 2010.
- Corrales-García, J. y Flores-Valdez, C.A. (2003). Nopalitos y tunas: producción, comercialización, poscosecha e industrialización. CIESTAAM- Programa Nopal, Universidad Autónoma de Chapingo México. 225 p.

- Dangyang, K., Yahia, E., Mateos, M. y Kader, A.A. (1994). Ethanollic Fermentation of 'Bartlett' Pears as Influenced by Ripening Stage and Atmospheric Composition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119 (5), 976-982.
- Guevara, J.C., Yahia, E.M. y Brito de la Fuente, E. (2001). Modified Atmosphere Packaging of Prickly Pear Cactus Stems (*Opuntia* spp.). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34, 445-451.
- Guevara, J.C., Yahia, E.M., Brito de la Fuente, E. y Biserka, S.P. (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 Biol. and Technol.* 29 (2), 167-176.
- Harmon, A.D. (1997). Solid-Phase Microextraction for the analysis of flavors. En: *Techniques For Analyzing Food Aroma*, (Marsili, R., eds), Pp. 81-112. Marcel Dekker, Inc, Nueva York.
- HunterLab (2010). Color Theory. Disponible en:  
<http://www.hunterlab.com/ColorEducation/ColorTheory>. Accesado: 24 noviembre 2010.
- Hernández-Zaragoza, J.B., Caballero-Badillo, C.E., Rosas-Juárez, A., López-Lara, T., Hinojosa-Torres, J. y Castaño, V.M. (2007). Modification of Portland cement mortars with cactus gum. *Chemistry and chemical technology* 1(3), 175-177.
- Kader, A.A. (1992). Postharvest Biology and Technology: An Overview. En: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, (Kader, A. A.), Pp. 15-20. Editorial University of California, California.

Kato-Naguchi, H. (2001). Wounding stress induces alcohol dehydrogenase in maize and lettuce seedlings. *Plant Growth Regulation* 35 (3), 285-288.

Kato-Nagushi, H. y Yasuda, Y. (2007). Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 164 (8), 1013-1018.

Kimmerer, T.W. y MacDonald, R.C. (1987). Acetaldehyde and Ethanol Biosynthesis in Leaves of Plants. *Plant Physiol.* 84 (4), 1204-1209.

Kozlowski, T.T. y Pallardy, S.G. (1997). *Physiology of Woody Plants*. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, New York. 411 p.

Kürsteiner, O., Dupuis, I. y Kuhlemeier, C. (2003). The pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiol.* 132 (2), 968-978.

Nerd, A., Dumoutier, M. y Mizrahi, Y. (1997). Properties and postharvest behavior of the vegetable cactus *Nopalea cochenillifera*. *Postharvest Biol. and Techno.* 10 (2), 135 - 143.

Pelayo, C., Ebeler, S.E. y Kader, A.A. (2003). Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 °C in air or air + 20 kPa CO<sub>2</sub>. *Postharvest Biol. and Techno.* 27, 171-183.

- Pelayo-Zaldívar, C. (2010). Environmental effects on flavor changes. En: Handbook of fruit and vegetable flavors, (Hui Y.H., Chen Feng and Nollet L.M.L.), Pp. 73-91. Editorial John Wiley and Sons, Inc., E.U.A.
- Ponce-Valadez y M., Watkins, C.B. (2008). Fermentation and malate metabolism in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations in two strawberry cultivars. *Physiologia Plantarum* 134 (1), 121-133.
- Purvis, A.C. (1997). The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. *HortScience* 32 (7), 1165-1168.
- Quevedo-Preciado, K.L., Villegas-Ochoa, M.A., González-Ríos, H. y Rodríguez-Félix, A. (2005). Calidad de nopal verdura mínimamente procesado. Efecto de temperatura e inhibidores del oscurecimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(3), 261-270.
- Ramayo-Ramirez, L., Saucedo-Veloz, C. y Lakshminarayana, S. (1978). Prolongación de la vida de almacenamiento del nopal hortaliza (*Opuntia inermis* Coulter) por refrigeración. *Chapingo, Nueva Época* 10, (30-32).
- Reid, M.S. (2007). Maduración e Índices de Madurez. En: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas (A. A. Kader y C. Pelayo-Zaldivar), Pp. 63-71. Editorial University of California, California.



- Robles- Rodriguez, M.B., Rodríguez- Huevo, E., Colina- Irezabal, M.L., Pelayo- Zaldívar, C. y Bósquez- Molina, E. (2008). Efecto del envasado al vacío y en atmósfera de N<sub>2</sub> del nopal desespinado (*Opuntia ficus indica*) var. Milpa Alta. 12-14 Marzo. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: *V Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*.
- Rodriguez-Felix, A. (2002). Postharvest physiology and technology of cactus pear fruits and cactus leaves. *Acta Hort.* 581, 191-199.
- Rodríguez-Félix, A. y Cantwell, M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition* 38 (1), 83 - 93.
- Rodriguez-Felix, A. y Villegas-Ochoa, M.A. (1998). Postharvest handling of cactus (*Opuntia* spp.) stems. CACTUSNET-FAO Newsletter. Università degli Studi di Reggio Calabria. Universidad de Chile 4, 10-13.
- Rodríguez Fuentes, H. (2009). Cultivo orgánico del nopal. Editorial Trillas, México. 76 p.
- Sáenz, C. (2004). Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia* spp. En: El Nopal, Tópicos de actualidad, (Esparza, G., Valdez, R. y Méndez, S.), Pp. 211-222. Editorial Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco. México.
- Saltveit, M.E. (1998). Fresh cut product biology. In: Fresh cut product: Maintaining Quality and Safety, (Cantwell, M. eds), Pp. 1-8. California.

- Saltveit, M.E. (2001). Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 21, 169-177.
- SIAP, 2009. Estacionalidad de nopalitos. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>. Accesado: 24 noviembre 2010.
- Stintzing, F.C. y Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (2), 175 - 194.
- Tadege, M., Dupuis, I. y Kuhlemeier, C. (1999). Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 4 (8), 320-325.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, Massachuset. 623 p.
- Watkins, C.B., Manzano-Mendez, J.E., Nock, J., Zhang, J. y Maloney, K.E. (1999). Cultivar variation in response of strawberry fruit to high carbon dioxide treatments. *J Sci Food Agric* 79, 886-890.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D. y Joyce, D. (1998). *Introducción a la fisiología poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. Editorial Acribia S.A., Mexico. 240 p.

## **6. Artículo 2 Conservation of fresh organic cactus stems (*Opuntia ficus indica* Mill.) cv. Atlixco in modified atmospheres**

Juliana Osorio-Córdoba<sup>1</sup>, Clara Pelayo-Zaldívar<sup>1</sup>, Elsa Bosquez-Molina<sup>1</sup>, José R. Verde-Calvo<sup>1</sup>, Mónica Ponce-Valadez<sup>2</sup>, Fernando Díaz de León-Sánchez<sup>2</sup>, Eva Rodríguez-Huezo<sup>3</sup>.

<sup>1,2</sup> Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, México D.F. CP 09340, México.

<sup>3</sup>Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Avenida Tecnológico s/n Colonia Valle de Anáhuac 12 C.P. 55210 Ecatepec, Edo. de México.

### **6.1 Abstract**

The effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the conservation of cactus stems cv. Atlixco cultivated in an organic system was studied in the present work. Atmospheres containing air; 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> were applied to cactus stems after harvest and spines removal; quality attributes and the accumulation of fermentation metabolites were evaluated during storage at 4 °C. Cactus stems had a good initial quality determined by high values of titratable acidity (1%), firmness (30.1N) and lightness (L\* = 49.3). There were not significant differences in titratable acidity and color between the control and the treated cactus stems, but MAP reduced weight loss (from 8 to 1 % after 15 days of storage). Chilling injury, characterized by pitting and hydrosis, was detected earlier and with a higher incidence in the control than in the treated cactus stems. Cactus stems had a low initial concentration of acetaldehyde (20 ppm) and no ethanol was detected and MAP did not induce the production of these fermentation metabolites. This fact confers a practical advantage to cactus stems cv. Atlixco making it a good candidate for the use of MAP. Additionally, Atlixco nopal maintained its commercial quality in an atmosphere with N<sub>2</sub> for 15 days.

Key words: quality, wound, refrigeration, acetaldehyde, ethanol, modified atmosphere

<sup>1</sup>Department of Biotechnology <sup>2</sup> Department of Health Sciences.

## 6.2 Introduction

In Mexico, cultivation of prickly pear (tuna) and cactus stems, (nopal), occupies an area of 12 thousand ha distributed in three regions: Northern Center, Center and the region of Puebla; in these regions the surface area occupied by nopal reaches 3 thousand, 8 thousand and 174 ha, respectively and the annual volume of production is 744, 254 ton (SIAP, 2009). Commercial plantations of nopal are managed by both traditional and organic methods of production; the first, involves the use of pesticides for insect and disease control, as well as the application of chemical fertilizers to achieve a good balance of nutrients and minerals in the soil and the plants, while the second involves the use of biological control for pest management and the application of organic fertilizer (Rodriguez, 2009).

Nopal cultivars have been recently classified and registered in the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) which head office is located in Geneva (Switzerland) (Cervantes and Gallegos, 2007). According to this classification, the most important nopal cultivars based on their cultivated surface are Milpa Alta or Esmeralda, Atlixco or Villanueva, Copena V1, Copena V8 and Nopalea.

In certain areas of Mexico, nopal consumption is well deeply-rooted due to their typical flavor of an acid taste with aromatic herbal notes, their low cost and their nutritional and functional properties such as their antioxidant capacity, their diuretic effect and the effect on the uric acid metabolism, anti-inflammatory and analgesic, hypoglycemic and anti-diabetic, anti-ulcerogenic and antihyperlipidemic properties as well as their effect on cholesterol reduction (Stintzing and Carle, 2005). Because of this variety of pharmacological effects and its richness in nutraceutical compounds, nopal has attracted the attention of researchers in several parts of the world, including Mexico (Stintzing and Carle, 2005; Cruz-Hernández, 2007) pointing to an increase on its demand in the near future.

In addition, the presence of Latin communities in the United States of America and Canada who look for ethnic food creates a current demand for nopal. The demand in domestic and exportation markets might grow in the short term if the offered product fulfills

the consumer needs and quality expectations. Cactus stems without spines packaged in adequate size containers may satisfy this demand and besides presenting a product with an aggregated value, it may contribute to reduce postharvest losses, which have been conservatively calculated as 1.2 million dollars annually. One of the reasons for such higher losses is the lack of market and the decrease on the price reaching limits that become unaffordable for the producers from May to October (Callejas- Juárez et al., 2009).

Scientific reports about the conservation of fresh nopal as whole cladodes are limited (Cantwell et al., 1992; Cantwell, 1995; Rodriguez-Felix and Villegas-Ochoa, 1997) and practically there are not studies about the cladodes without spines. The main challenges that offers this way of presenting the product is the darkening of the cut areas after the operations for removing the spines and for adjusting the form and size of the stem, microbial growth in the exposed tissues (Nguyen-the and Carlin, 1994), mucilage exudation, excessive dehydration causing the bending of the cladode and the maintenance of its bright green color and its typical fresh flavor as well as its nutritional and functional properties.

Refrigeration and modified atmospheres are among the most utilized postharvest technologies for conservation of horticultural products. The recommended temperatures for cactus stems conservation are between 5 °C and 10 °C with a relative humidity of 90-95 % (Cantwell, 2007); however, nopal can develop chilling injury (CI) after two weeks at 5 °C and after 22 days at 10 °C (Rodriguez-Felix and Villegas-Ochoa, 1997). CI is a physiological disorder that occurs at low non-freezing temperatures characterized for changes in the respiration rate and ethylene production, as well as for symptoms that adversely affect the product appearance. Products sensitivity to this physiological disorder depends on the species and varieties among other factors. In the particular case of cactus stems Milpa Alta variety, the injury is presented as irregular dark spots on the surface and softening of the product (Ramayo et al., 1978 y Nerd et al., 1997). Cantwell (1992) describes these symptoms in *Opuntia ficus indica* as loss of the green color and darkening of the surface. Symptoms of chilling injury for Atlixco variety have not been documented.

Modified atmosphere packaging (MAP) is a supplement to refrigeration and it involves the placement of the product in a pre-shaped tray covered with a plastic film with or without

the addition of N<sub>2</sub>, mixtures of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or only CO<sub>2</sub>. This technology, besides reducing the symptoms of chilling injury, delays chlorophyll degradation, texture changes and dehydration caused by product transpiration (Kader, 1986; Kader, 2002). Previous research from our group showed that nopal cv. Milpa Alta without spines from commercial orchards which use a conventional culture system, packaged with a N<sub>2</sub> atmosphere in polysweat bags (Bolco, D.F., México) permeable to O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub>, and stored at 7 and 4 °C ± 1 °C, maintained its quality for 20 days (Robles-Rodríguez et al., 2008; Osorio-Córdoba et al., 2011).

A disadvantage for the use of the MAP technology is that products of fermentation (acetaldehyde and ethanol) can be accumulated in response to the stress conditions caused by low O<sub>2</sub> levels and/or high CO<sub>2</sub> levels inside the packages (Dangyang et al., 1994). Other abiotic factors that can induce the same effect are low temperatures from refrigeration and mechanical damage (Purvis, 1997; Tadege et al., 1999; Kursteiner et al., 2003; Kato-Noguchi and Yasuda, 2007), such as the one caused to the cactus stems by spine removal and border cutting (Osorio-Córdoba et al., 2011). However, fermentation metabolites production in response to abiotic stresses depends on the variety (Watkins et al., 1999; Pelayo et al., 2003 y Ponce-Valadez and Watkins, 2008). Those cultivars that do not show an increase in acetaldehyde and ethanol production or for which the increment is very low will be the best candidates for the use of this technology for postharvest conservation. The objective of the present work was to find the best conditions for quality conservation of organic nopal cv. Atlixco using modified atmosphere packaging. There are no scientific reports about the use of this technology for postharvest conservation of this variety of nopal.

## **6.3 Materials and Methods**

### **6.3.1 Biological material**

Cactus stems (*Opuntia ficus indica* Mill.) cultivar Atlixco were harvested in commercial fields with an organic system of production located in Otumba, State of Mexico (19°41'52,5" N; 98°45'25,94"). Cladodes were manually harvested in the morning (6-7 am) for limiting compositional variations due to the crassulacean metabolism characteristic of these plants

(Rodríguez-Félix and Villegas Ochoa, 1998; Corrales-Garcia and Flores-Valdez, 2003; Taiz and Zeiger, 2006) and transported in plastic bins, protected from the sun, to the laboratory.

### 6.3.2 Experimental design and treatments

Cladodes were selected by size (20 to 25 cm of length), color uniformity and absence of defects according to the official norm of quality (CODEX STAN 185, 1993) and disinfected with a solution containing 200 ppm of active chlorine. Then, they were randomly divided into two groups; from one, the spines were removed and the borders cut, while the other was not subjected to this processing operation. Cladodes without spines were placed in 35 micron thick polysweat bags (Bolco, D.F., México) permeable to O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O vapor (260.6 gO<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h/37.8 °C and 90% de R.H.; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24h at 1 atm, 23°C and 0% R.H.). Vacuum was applied to the bags using a packing machine Multivac C100 (Germany) and then, it was removed by the injection of three different atmospheres (air; nitrogen; and a mixture of 5 kPa O<sub>2</sub> +4 kPa CO<sub>2</sub> supplemented with N<sub>2</sub>), bags were sealed and stored at 4 °C ± 1°C; also, cladodes without spines were stored in clamshell packages (without modified atmosphere) at the same temperature, while cladodes with spines were placed in clamshell packages at 4 °C ± 1 °C and at room temperature (23 °C ± 2 °C). The experimental unit was 4 cladodes with three repetitions for each treatment and a completely randomized experimental design was used. Quality attributes and fermentation metabolites were determined immediately after harvesting and after 5, 10, 15, 20 and 25 days of storage.

### 6.3.3 Quality attributes

Color. To evaluate changes in the green color, ten 2.3 cm diameter disks were obtained from the areas without spines of each cladode. Color was measured with a colorimeter HunterLab Model ColorFlex ® (Hunter AssociatesLaboratory, USA). Results are reported as the three color parameters, lightness (L\*), chroma (C\*) and hue (h\*) and as the ΔE (degree on color difference through time) calculated using the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  and  $\Delta b^*$  are the differences between the initial value of  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $y b^*$  before storage and the values at the sampling date (HunterLab, 2010)

Firmness. The maximal force necessary to penetrate 7mm of the cladode base was determined with a penetrometer (tr®, Italy) with a 5mm diameter probe. Results are reported in Newtons (N) (Reid, 2007).

Titrateable Acidity (TA). The juice from each experimental unit was obtained using an electric juice extractor and it was titrated with 0.1N sodium hydroxide using phenolphthalein as indicator. The results are expressed as grams of malic acid per 100 g of fresh juice of cactus stem (AOAC, 2000).

Weight loss. A digital Explorer Precision balance (OHAUS Corporation® - USA) was used to measure the initial weight and the changes on weight during storage. Results are expressed as the percentage of weight loss with respect to the initial weight (Burton, 1982).

Pitting index. A scale in terms of percentage was elaborated to determine the pitting as a chilling injury symptom in the areas where no spines were removed, where 0 = absence of damage (0% of the surface affected); 1 = low (1 - 5%); 2 = medium (6 – 10%); 3 = moderate (11 - 20%); and 4 = severe (>20 %) (Fig. 6). Pitting index was obtained applying the following equation to the obtained data:

$$\sum_{i=1}^{i=n} = \frac{(1xn_1) + (2xn_2) + (3xn_3) + (4xn_4)}{n}$$

Where  $n_1$  = number of cladodes with grade 1, ...,  $n_4$  = number of cladodes with grade 4 and  $n$  = total number of cladodes.



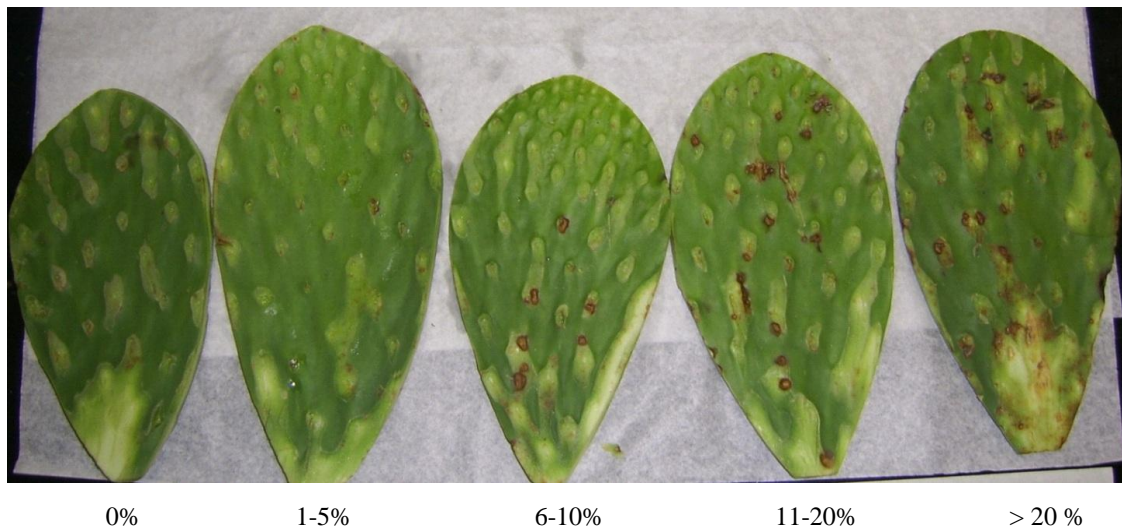


Figure 6. Scale of damage to evaluate the percentage of area affected by pitting in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs.

#### 6.3.4 Fermentation metabolites

Nopal juice from each experimental unit obtained as previously described was frozen with liquid nitrogen and stored at -20 °C until its analysis. For quantification of acetaldehyde and ethanol concentrations in the samples, 6 g of juice were placed in a 30 mL glass vial containing 9 mL of distilled water and 3.6 g of NaCl to favor the release of the volatiles from the matrix into the headspace (Harmon, 1997), the vial was covered with a black viton septum, sealed with a metallic ring and the content was mixed in a Thermolyne 16700 vortex for 90 s. For extraction and concentration of the fermentation metabolites from the headspace, the solid phase microextraction (SPME) technique was used with a 75  $\mu$  fused silica fiber coated with Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, CA). The fiber was exposed for 10 min to the headspace, while the vial was maintained in a water bath at  $34 \pm 1$  °C. The fiber was desorbed in a CG Varian 3900 (Varian, Palo Alto, C.A.) equipped with a flame ionization detector, using a HP-INNOWAX capillary column with 0.32 mm I.D, 0.25  $\mu$ m of thickness and 60 m long (Agilent Technologies, USA). Injector and detector temperatures were 150 °C and 260 °C, respectively. The initial oven temperature was 80 °C and it was raised at a rate of 10 °C per minute until reaching 130 °C where it was held for 6 minutes. Fermentation metabolites were identified comparing the retention times

with commercial standards extracted, concentrated and analyzed by the same analytical procedure. Concentrations were calculated using standard curves of aqueous dilutions of acetaldehyde (Aldrich) and ethanol (J.T. Baker).

### **6.3.5 Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using the software Statgraphics Centurion XV version 15.2.14. A multifactorial ANOVA was applied to the data to determine if there were significant differences in the analyzed variables between treatments and the interaction with the time of storage. When significant differences were detected, the Tukey test for multiple mean comparison was performed ( $\alpha= 0.05$ ). For the analysis of weight loss, the dependency of the data to the initial value was eliminated and they were analyzed as independent values.

## **6.4 Results and Discussion**

### **6.4.1 Quality attributes**

Cactus stems had a good initial quality determined by the high TA values (1%), firmness (30.1N) and lightness ( $L^*= 49.3$ ). During storage, TA decreased in the cladodes from all treatments, but the effect was more pronounced in those stored at room temperature (Table 2). This decrease might be due to the use of malic acid, the most predominant organic acid in nopal, as a respiratory substrate (Taiz and Zeiger, 2006). Since the respiratory activity is higher at room temperature, this might explain the higher consumption in these conditions. Similarly, Cantwell et al. (1992) reported a reduction in the acidity of cactus stems stored at 5°C. It has been reported that the use of MAP maintain a higher acidity in the products, on one side, because the modified atmosphere inside the package reduces the respiration rate and therefore, the consumption of organic acids, and on the other, because the CO<sub>2</sub> present in the applied and/or produced by the product modified atmosphere, acidifies the tissues (Kader, 1986; Kader, 2002); however, this effect was only observed after 20 days of storage in the cladodes stored in the MAP containing 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>.

At the end of the storage period, the cactus stems stored in MAP containing 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> maintained their firmness, while those stored in air which had lower values, probably because there was not enough CO<sub>2</sub> to inhibit the action of enzymes involved in cell wall degradation (Kader, 1986). On the contrary, the cladodes stored at room temperature showed a significant increase in their firmness due to the excessive weight loss causing that the tissue became tough; similar results have been reported for the variety Milpa Alta (Osorio-Córdoba et al., 2011). There were no significant differences neither among the different treatments nor among the different days of storage in the color of the cactus stems; this might be explained by the variability observed in the data (Table 2); however, cactus stems stored in MAP had the tendency to maintain better their color. Guevara et al. (2001) reported that cladodes with spines stored in MAP at 5 °C maintain their color, while controls un-packaged changed from a bright green to a dull green.

Table 2. Quality attributes of nopal 'Atlixco' stored in clamshell packages (with spines at 23 ± 1°C and 4 ± 1 °C and without spines at 4°C) and MAPs (air, 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>). Values are the average of three repetitions ± its standard deviation.

Variable	Treatment	Days of storage					
		0	5	10	15	20	25
Titratable acidity (% malic acid)	With spines 23°C	0.99±0.02a*	0.79±0.03b	0.40±0.02a			
	With spines 4°C	0.99±0.02a	0.93±0.02a	0.86±0.02b			
	Without spines 4°C	0.99±0.02a	0.72±0.02b	0.57±0.02b	0.57±0.02b	0.43±0.02b	
	Air	0.99±0.02a	0.75±0.02b	0.64±0.02b	0.57±0.02b	0.49±0.00b	0.42±0.00b
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	0.99±0.02a	0.85±0.02b	0.72±0.02b	0.62±0.02b	0.56±0.00a	0.47±0.02b
	N <sub>2</sub>	0.99±0.02a	0.72±0.02b	0.64±0.02b	0.54±0.02b	0.49±0.00b	0.45±0.00b
Firmness (N)	With spines 23°C	30.1±5.30a	46.9±5.56a	40.7±6.32a			
	With spines 4°C	30.1±5.30a	41.9±5.46b	37.1±3.21b			
	Without spines 4°C	30.1±5.30a	30.7±4.76b	33.6±8.13b	28.2±4.82b	28.1±4.09b	
	Air	30.1±5.30a	40.9±2.67b	31.8±4.55b	30.7±5.73b	28.8±5.19b	17.6±3.77a
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	30.1±5.30a	37.3±4.69b	31.1±3.01b	30.1±5.73b	24.5±2.49b	30.1±4.85b
	N <sub>2</sub>	30.1±5.30a	41.4±3.07b	35.5±7.20b	30.6±4.18b	29.1±5.33b	29.6±2.56b
Color (ΔE)	With spines 23°C	0	4.12±2.11a	5.95±4.01a			
	With spines 4°C	0	3.61±4.89a	3.50±2.70a			
	Without spines 4°C	0	3.17±2.82a	5.41±3.35a	5.82±4.55a	6.03±3.69a	
	Air	0	3.98±2.13a	4.19±2.68a	3.51±2.29a	5.32±3.55a	5.39±3.46a
	5 kPa O <sub>2</sub> + 4 kPa CO <sub>2</sub>	0	3.09±2.10a	3.30±2.02a	2.62±1.51a	5.36±3.65a	4.21±2.36a
	N <sub>2</sub>	0	2.37±1.02a	3.39±2.81a	5.69±2.19a	4.07±2.96a	3.70±0.51a

\*Values followed by the same letter in each column are not significantly different (Tukey HSD 95%).

Weight loss (WL) of cactus stems in MAPs was below 2% because the high relative humidity inside the package limits the transpiration of the product, maintaining its fresh appearance. On the contrary, in the control cactus stems (without spines in clamshell containers), the weight loss approached 11 % after 25 days and it was close to 8 % only after 15 days for those stored at room temperature (Fig. 7), and in both cases, showed symptoms of wilting. Rodriguez-Felix and Villegas-Ochoa (1997) reported signs of wilting in nopal cultivar COPENA F-1 with a WL of 5 % and for cultivar COPENA V-1 with a WL of 12 %. These data and those obtained in the present study for nopal Atlixco support the idea that the percentage of WL at which the quality is adversely affected depends on the variety (Kays, 1997).

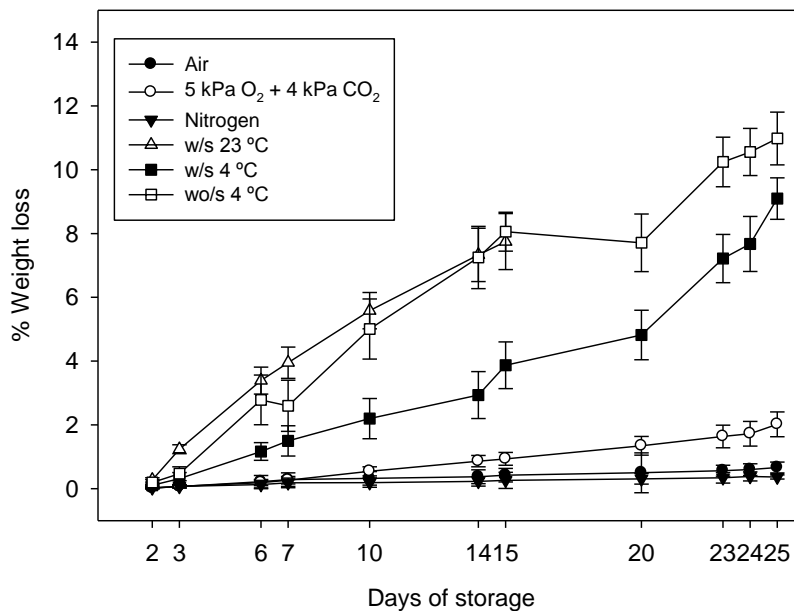


Figure 7. Weight loss in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C and 23 °C in clamshell packages and MAPs; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation.

Regarding the index of damage, small depressed ocher-colored regions (pitting) and small zones of translucent water-soaked tissue (hydrosis) were observed in the areas of tissues where spines do not grow of the cladodes stored at 4 °C, but not in those stored at room temperature, which suggest that these are CI symptoms indicating that 'Atlixco' is a

sensitive variety to this physiological disorder. These results differ from reports from other authors who show that the spotting or darkening of the surface, the softening and the loss of green color are symptoms of CI (Ramayo et al., 1978; Cantwell, 1992; Nerd et al., 1997) and are different to previous results from our group showing that cultivar Milpa Alta does not develop CI at 4 °C (Osorio-Córdoba et al., 2011). This difference might be explained by the origin of Atlixco variety from warmer regions than those in where Milpa Alta is produced. Also, unlike Milpa Alta nopal, Atlixco did not show darkening in the zones without spines, probably due to a cross-tolerance mechanism by which CI is perceived by the tissue as more harmful than the physical damage from the spines removal (Saltveit, 2000; Saltveit, 2001; Rivera et al., 2007). The presence of damage by pitting in a degree higher than 1.0 adversely affected the visual appearance of nopal Atlixco; therefore, it was assumed that the shelf life was over with pitting indexes  $\geq 1.0$  (more than 5 % of affected surface). MAP delayed the appearance of the pitting, the damage appeared after 10 days of storage in cactus stems stored in clamshell packages (without spines at 4 °C) and only after 15 days in those stored in MAP (Fig. 8). These results confirm that modified atmospheres delay the appearance of CI symptoms (Kader, 1986).

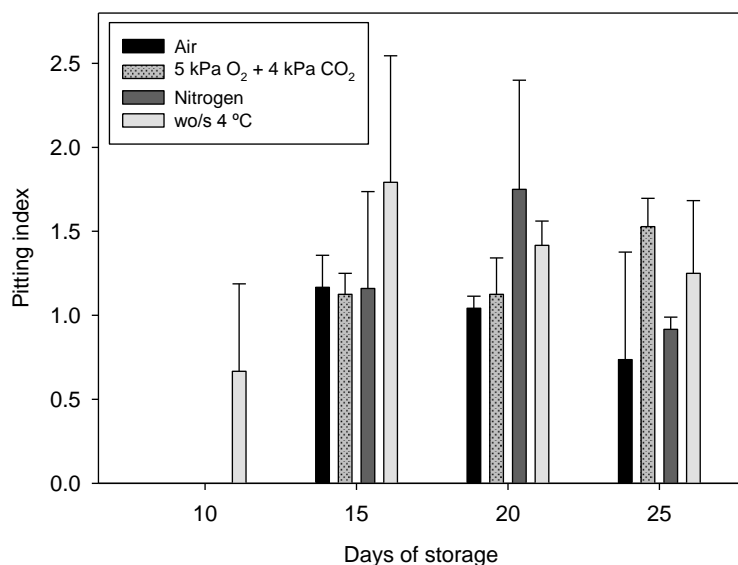


Figure 8. Pitting index in cactus stems 'Atlixco' stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation.

### 6.4.2 Fermentation metabolites

Cactus stems from all different treatments presented approximately 20 ppm or lower acetaldehyde concentrations and levels of this compound did not increase during storage, except in the cladodes stored in the atmosphere containing 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>, which showed an isolated and non-consistent increase only after 10 days of storage (Fig. 9). Regarding ethanol accumulation, traces (less than 50 ppm) were detected in control cladodes and in those stored in MAP (data not shown). These results suggest that in nopal 'Atlixco', fermentation metabolites production is not increased by the stress generated by the spines removal, the low temperature and the MAP as it occur in other plant tissues (Dangyang et al., 1994; Kursteiner et al., 2003; Kato-Noguchi and Yasuda, 2007), including cactus stems from Milpa Alta variety (Osorio-Córdoba et al., 2011). A possible explanation for these results is that the pyruvate accumulated under stress conditions is metabolized by alternative pathways such as conversion to acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase or to alanine by alanine aminotransferase (Purvis, 1997; Tadege et al., 1999). Since the aroma profile is not altered by an increase in the acetaldehyde and ethanol accumulation, this fact confers a practical advantage to this nopal cultivar making it a good candidate for the use of MAP.

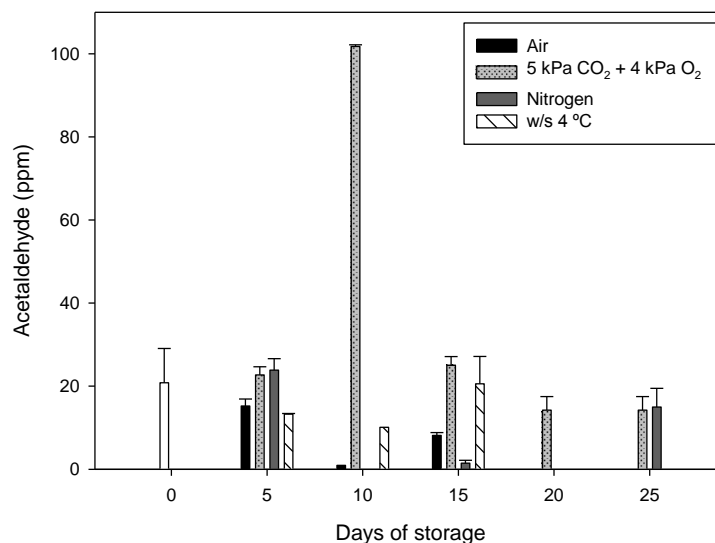


Figure 9. Acetaldehyde levels in cactus stems 'Atlixco' without spines stored at 4 °C in clamshell packages and MAPs. The empty bar shows the initial value; w/s: nopal with spines, wo/s: nopal without spines. Values are the average of three repetitions and the vertical bars represent the standard deviation.

## 6.5 Conclusions

The use of MAP clearly reduced the weight loss, but not the acidity loss and did not have any effect neither in the firmness nor in the color of nopal stored at 4 °C. At this temperature, the cactus stems showed symptoms of CI which were delayed for 5 days by the use of MAP maintaining a low index of damage and therefore an acceptable quality, especially in cactus stems stored in MAPs containing air and N<sub>2</sub>. These results support some of the already known advantages of this postharvest technology. Accumulation of fermentation metabolites were not induced by the use of MAP, which makes cultivar Atlixco different from other plant tissues and therefore, suitable to be conserved using this technology. The best response in nopal Atlixco stored in MAP was observed in the treatment containing N<sub>2</sub> in which the cactus stems without spines were maintained for a period of 15 days at 4 °C showing good quality attributes, a low index of damage (close to 1.0) and low levels of fermentation metabolites.

## 6.6 References

- A.O.A.C. 2000. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17<sup>th</sup> Ed. Gaithersburg, Maryland, EUA.
- Burton, W.G. 1982. Post-harvest physiology of food crops. Longman, New York, E.U.A.
- Callejas-Juárez, N., J.A. Matus-Gardea, J.A. García Salazar, M.A. Martínez-Damián, J.M. Salas-González. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, nopalito y derivados en el Estado de México, 2006. *Agrociencia* 43:73-82.
- Cantwell, M., A. Rodríguez-Félix and F. Robles-Contreras. 1992. Postharvest physiology of prickly pear cactus stems. *Scientia Horticulturae* 50: 1-9.



Cantwell, M. 1995. Postharvest management of fruits and vegetables stems, p. 120-143. In: G. Barbera, P. Inglese, and E. Pimienta-Barrios (eds). Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. Editorial FAO Plant Production and Protection, Roma.

Cantwell, M. 2007. Nopalitos: Cactus Stems. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. 09 December 2010.

<<http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Veg/nopalitos.shtml>>

Cervantes, H. J. and V. C. Gallegos. 2007. El Nopal, Símbolo y sustento. XVI Reunión del Comité Nacional del Sistema Producto Nopal y Tuna y Primer Foro Estatal de Nopal y el Financiamiento Rural. Dolores Hidalgo, Guanajuato. 25-27 Abril.

Corrales-García, J. and C.A. Flores-Valdez. 2003. Nopalitos y tunas: producción, comercialización, poscosecha e industrialización. CIESTAAM- Programa Nopal, Universidad Autónoma de Chapingo México.

CODEX STAN 185. 1993. Norma del CODEX para el nopal. 20 Septiembre 2010.

[http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es)

Cruz-Hernández A. 2007. Análisis del contenido nutrimental del nopal verdura. XVI Reunión del Comité Nacional del Sistema Producto Nopal y Tuna y Primer Foro Estatal de Nopal y el Financiamiento Rural. Dolores Hidalgo, Guanajuato 25-27 Abril.

Dangyang, K., E. Yahia, M. Mateos, A. Kader. 1994. Ethanolic fermentation of 'Bartlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119(5): 976–982.

Guevara, J.C., E.M. Yahia, y E. Brito de la Fuente 2001. Modified Atmosphere Packaging of Prickly Pear Cactus Stems (*Opuntia* spp.). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34: 445-451.

Harmon, A.D. 1997. Solid-Phase Microextraction for the analysis of flavors, p. 81-112. In: Marsili, R., (ed). *Techniques For Analyzing Food Aroma*. Marcel Dekker, Inc, Nueva York.

HunterLab. 2010. Color Theory. 24 Nov. 2010.  
<<http://www.hunterlab.com/ColorEducation/ColorTheory>>

Kader, A. A. 1986. Biochemical and physiological bases for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40(5): 99-104.

Kader, A. A. 2002. Modified Atmospheres during transport and storage, p.135-144. In: Kader, A.A. (ed.). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3<sup>rd</sup> Ed. Univ. California Agric. Natural Resources, Oakland, C.A.

Kato-Noguchi, H. and Y. Yasuda. 2007. Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. *J of Plant Physiol.* 164: 1013-1018.

Kays, S. J. 1997. *Postharvest Physiology of Perishable Plant Products*. Exon Press. Athens, GA.

- Kürsteiner, O., I. Dupuis, C. Kuhlemeier. 2003. The *pyruvate decarboxylase 1* gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiology* 132: 968-978.
- Nerd, A., M. Dumotier, Y. Mizrahi. 1997. Properties and postharvest behavior of the vegetable cactus *Nopalea cochenillifera*. *Postharvest Biol. Technol.* 10: 135-143.
- Nguyen-the, C. and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 34: 371-401.
- Osorio-Córdoba, J., C. Pelayo-Zaldívar, J.R. Verde-Calvo, M. Ponce-Valadez, F. Díaz de León-Sánchez, E. Bosquez-Molina and Ma. E Rodríguez-Huezo. 2011. Conservación de nopal verdura ‘Milpa Alta’ (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10 (1): 93-104.
- Pelayo, C., E. Ebeler, A.A. Kader. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 °C in air or air + 20 kPa CO<sub>2</sub>. *Postharvest BiolTechnol.* 27: 171-183.
- Ponce-Valadez, M. and C.B. Watkins. 2008. Fermentation and malate metabolism in response to elevated CO<sub>2</sub> concentration in strawberry cultivars. *Physiologia Plantarum* 134: 121–133.
- Purvis, A. 1997. The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plants tissues. *HortScience* 32 (7): 1165-1168.

- Ramayo, R.L., C. Saucedo, S. Lakshminarayana 1978. Prolongación de la vida de almacenamiento del nopal hortaliza (*Opuntia inermis* Coulter) por refrigeración. Chapingo: Nueva Época 10: 30-32.
- Reid, M.S. 2007. Maduración e Índices de Madurez, p. 63-71. In: A. A. Kader y C. Pelayo-Zaldivar (eds.). Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas . Univ. California, Agric. Natural Resource, Oakland, CA.
- Rivera, F., C. Pelayo-Zaldívar, F. Díaz de León, B. Buentello, M. Castillo-Rivera, and L.J. Pérez-Flores. 2007. Cold conditioning treatments reduces chilling injury in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* ) stored at different temperatures. Journal of Food Quality 30: 121-134.
- Robles- Rodríguez, M.B., E. Rodríguez- Huevo, M.L. Colina- Irezabal, C. Pelayo- Zaldívar and E. Bósquez- Molina. 2008. Efecto del envasado al vacío y en atmósfera de N<sub>2</sub> del nopal desespinado (*Opuntia ficus indica*) var. Milpa Alta. V Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 12-14 Marzo.
- Rodríguez-Félix, A. and M. A. Villegas-Ochoa 1997. Quality of cactus stems (*Opuntia ficus-indica*) during low temperature storage. Journal of the Professional Association for cactus development 142-152.
- Rodríguez-Felix, A. and M.A. Villegas-Ochoa 1998. Postharvest handling of cactus (*Opuntia* spp.) stems. CACTUSNET-FAO Newsletter. UniversitadegliStudi di Reggio Calabria. Universidad de Chile 4: 10-13.

Rodriguez, F. H. 2009. Cultivo orgánico del nopal. Editorial Trillas, México.

Saltveit, M.E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 61-69.

Saltveit, M.E. 2001. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 169-177.

SIAP. 2009. Estacionalidad de nopalitos. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. 09 Dic. 2010.< <http://www.siap.gob.mx/>>

Stintzing, F.C. and R. Carle. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. *Mol. Nutr. Food Res* 49: 175-194.

Tadege, M., I. Dupuis, C. Kuhlemeier. 1999. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 4 (8): 320-325.

Taiz, L. and E. Zeiger 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc, Massachuset.

Watkins, C.B., J.E Manzano-Mendez, J.F. Nock, J. Zhang, K.E. Maloney. 1999. Cultivar variation in response of strawberry fruit to high carbon dioxide treatments. *J SciFoodAgric* 79: 886-890.

## 7. Nota Corta VOLÁTILES DE NOPAL VERDURA CONSERVADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Juliana Osorio-Córdoba<sup>1</sup>, Clara Pelayo-Zaldívar<sup>1</sup>, Elsa Bosques-Molina<sup>1</sup>, José Ramón Verde-Calvo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>[cpel@xanum.uam.mx](mailto:cpel@xanum.uam.mx). Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, México D.F. C.P 09340.

### 7.1 RESUMEN

El nopal es una planta cactácea cuyos tallos modificados o cladodios se consumen en México y las comunidades latinas de Norteamérica por sus propiedades funcionales y su sabor ácido dominado por notas herbáceas. El envasado en atmósfera modificada (EAM) conserva la calidad de esta hortaliza hasta por 20 días pero puede aumentar la producción de metabolitos de fermentación y modificar su aroma. El objetivo del presente trabajo fue identificar algunos volátiles asociados al aroma del nopal conservado en EAM. Los cladodios sin espinas se colocaron en bolsas polysweat en aire, nitrógeno y una mezcla de 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>, y los nopales control en envases clamshell. Todos los tratamientos se almacenaron a 4 ± 1 °C y a intervalos regulares se tomaron muestras para cuantificar volátiles. Se identificaron 84 compuestos, de los cuales 21 estuvieron presentes en la mayoría de las muestras analizadas. Dentro de éstos se identificaron aldehídos asociados a notas herbáceas como el hexanal, 2,4-hexadienal y el 2-heptenal. Los dos primeros estuvieron presentes tanto en nopales control como en los conservados en EAM. El 2-nonenol, propio del metabolismo de plantas crasuláceas y que contribuye al aroma típico de la tuna, sólo se identificó al principio del almacenamiento. La presencia de limoneno se asoció con daño mecánico y el benzoato de etilo con la conservación en EAM, mientras que el 2-etil furano con la senescencia del nopal. Dado que los nopales en EAM produjeron volátiles con notas herbáceas, pero también volátiles no presentes en nopal no tratado, se concluyó que esta técnica de conservación puede modificar su perfil de olor.

**KEYWORDS:** aroma compounds, volatiles, modified atmosphere packaging (MAP), odor, cladodes, cactus stems, Milpa Alta nopal.

## 7.2 HIGHLIGHTS

Se analizaron volátiles del nopal verdura conservado en envases con atmósfera modificada (EAM). Se identificaron 84 compuestos, 21 de los cuales fueron los más frecuentes. Tres aldehídos se asociaron con notas herbáceas y el 2-nonenol con el aroma típico de la tuna. Los nopales en EAM produjeron volátiles con notas herbáceas y otros volátiles no presentes en los nopales control. Lo anterior sugiere que esta técnica de conservación puede modificar el perfil de olor.

## 7.3 INTRODUCCIÓN

El nopal es una planta endémica de América, de la cual se conocen 258 especies; 100 de ellas se encuentran en México. A través de la evolución, todas las especies de nopal han desarrollado características morfológicas que les han permitido adaptarse a la escasa disponibilidad de agua en el suelo, a las variaciones extremas de temperatura y en general a las condiciones que prevalecen en zonas áridas y semiáridas (Rodríguez, 2009). La resistencia de la planta a la sequía y su metabolismo típico de crasuláceas ha permitido que bajo condiciones de estrés medio ambiental la planta sea capaz de producir fruta, nopal verdura y forraje de calidad, así como acumular pigmentos y producir notas aromáticas características (Weckerle et al. 2001). El nopal verdura que corresponde a los tallos modificados o cladodios de estas plantas cactáceas se consume como hortaliza en México y las comunidades latinas de Norteamérica por sus propiedades funcionales y su sabor ácido dominado por notas herbáceas.

El manejo regular al que se somete el nopal antes de su comercialización consiste en eliminar las espinas junto con pequeñas porciones de tejido y en recortar la periferia de los cladodios para homogeneizar su forma (Rodríguez-Félix and Villegas-Ochoa, 1998). El daño físico ocasionado durante este tipo de procesamiento ligero causa un deterioro del producto y reduce su vida de anaquel (Cantwell et al. 1992; Salveit, 1998). El uso de tecnologías postcosecha, como el envasado en atmósfera modificada (EAM), permite conservar la calidad física y visual de este producto hasta por 20 días (Osorio et al., 2011), pero se desconoce su efecto en el perfil del olor. No existen reportes sobre los compuestos químicos responsables del aroma del nopal verdura fresco ni almacenado en EAM, información que es

esencial para determinar que variedad de nopal puede conservar mejor su olor típico con esta técnica de conservación.

En tuna, fruta de importancia comercial producida por algunas especies de nopal, Flath and Takahashi (1978) reportaron 61 volátiles constituyentes del aroma. Muchos de estos compuestos se han encontrado en otras frutas, como el 1-nonanol y 2-nonenol que son los volátiles responsables de las notas características a melón y pepino. Similarmente, Weckerle et al. (2001) reportaron que el aroma de tuna se puede describir como una mezcla de notas entre pepino y melón e identificaron a los compuestos 1-hexanol, 2-hexenol, 2-nonenol y 2,6-nonadienol como compuestos típicos de las plantas con metabolismo de crasuláceas (CAM). Adicionalmente, en tres variedades de tuna, Arena et al. (2001) identificaron 16 compuestos volátiles, de los cuales el aldehído (E)-2-hexenal y los alcoholes 2-pentenol, hexanol, 3-hexenol, 2-hexenol, 2-nonenol y 2,6-nonadienol estuvieron presentes en todas las variedades evaluadas. Agozzino et al. (2005) encontraron diferencias en el perfil aromático de la tuna, en las variedades amarilla y blanca los compuestos más abundantes fueron 2-hexenol y 2-nonenol, mientras que en la variedad roja el 1-hexanol se encontró en mayor concentración. También, observaron diferencias entre el perfil de aroma de una fruta fresca y una almacenada por 24 h, encontrando un incremento en la producción de 2-nonenol y 2,6-nonadienol y una reducción marcada en la cantidad de ésteres por efecto del tiempo. Finalmente, Bai et al. (2011) encontraron, en relación con las notas herbáceas del tomate, que los tratamientos como el frío y calor son factores de estrés que regulan la producción de volátiles C<sub>6</sub> como el hexenal y el 3-hexenal al modificar las actividades de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) e hidroperóxido liasa (HPL) de la vía de las lipoxigenasas. El objetivo del presente trabajo fue identificar algunos volátiles asociados al aroma de nopal verdura almacenado en EAM como trabajo previo al estudio del efecto que esta técnica de conservación tiene en el perfil sensorial de olor de esta hortaliza.



## **7.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.4.1 Material Biológico**

Se colectó nopal verdura (*Opuntia ficus indica* L.) variedad Milpa Alta de plantaciones comerciales ubicadas en Milpa Alta, México D.F (19°13'25" N; 99°01'47" O). Los cladodios fueron cosechados manualmente por la mañana (6-7 a.m.) y se transportaron en rejas de plástico al laboratorio.

### **7.4.2 Aplicación de tratamientos y diseño experimental**

Los cladodios fueron seleccionados por tamaño (20-25 cm de longitud), uniformidad de color y ausencia de defectos (norma oficial de calidad CODEX STAN 185, 1993), se desinfectaron con una solución de 200 ppm de cloro activo, posteriormente se desespinaaron y cada cladodio se sometió al recorte de la periferia. Los cladodios sin espinas se colocaron en bolsas fabricadas con una película polysweat (Bolco D.F., México) permeable al O<sub>2</sub>, al CO<sub>2</sub> y al vapor de agua (260.6 g O<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h / 37.8 °C y 90% de H.R.; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24h a una atmósfera, 23 °C y 0% H.R.) de 35 micras de espesor. Los envases se sometieron primero a un vacío el cual se generó utilizando una máquina empacadora Multivac C100 (Alemania) liberándose posteriormente con la aplicación de tres atmósferas: 1) aire, 2) nitrógeno y 3) mezcla de 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub> complementada con N<sub>2</sub>. Los envases se sellaron y almacenaron a 4 ± 1 °C. Como tratamiento control se colocaron nopales en envases clamshell almacenados a la misma temperatura. La unidad experimental fue de cuatro nopales y tres repeticiones por tratamiento y el diseño experimental fue completamente al azar. Inmediatamente después de la cosecha y a los 5, 10, 15, 20, 25 días de almacenamiento se tomaron muestras de todos los tratamientos para el análisis de compuestos volátiles.

### **7.4.3 Análisis de compuestos volátiles**

Se obtuvo el jugo del nopal mediante un extractor de jugos eléctrico (Oster ®), se congeló con N<sub>2</sub> líquido y almacenó a – 20 °C hasta su análisis. Se colocaron en viales de vidrio de 30 ml, 6 g del jugo de nopal, 3.6 g de NaCl y 9 mL de agua destilada, se taparon con un septo de vitón negro y sellaron con un aro metálico para posteriormente agitarse en

un vórtex Thermolyne 16700 mixer por 90s. Para capturar y concentrar los volátiles se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida utilizando una fibra de sílica de 75 µm de espesor recubierta con Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) (Supelco, Bellefonte, CA) la cual se expuso dentro del vial por 10 min, mientras éste permanecía en incubación en un baño de agua a  $34 \pm 1$  °C. Los compuestos fueron analizados en un cromatógrafo de gases HP 6890 *Plus* acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) equipado con una columna capilar HP-5 de 0.32 mm I.D. 0.25 µm de espesor y 6 m de longitud (Agilent Technologies, USA). Las temperaturas del inyector y detector fueron de 150 °C y 260 °C respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 40 °C manteniéndose por 2 minutos, posteriormente aumentó 6 °C hasta alcanzar los 125 °C donde se mantuvo por un minuto. Para la identificación inicial de los compuestos se utilizó la Biblioteca Nits versión 0.5a. Solo se confirmó la identificación de aquellos compuestos relacionados con notas herbáceas, con el metabolismo de crasuláceas o que aparecieron por efecto del tiempo de almacenamiento o de la atmósfera modificada aplicada mediante la inyección de estándares comerciales extraídos, concentrados y analizados con el mismo procedimiento analítico.

## **7.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En los extractos de nopal se lograron identificar 84 compuestos, de éstos se seleccionaron 21 que fueron los que aparecieron en la mayoría de las muestras evaluadas. Los compuestos seleccionados se agruparon en 6 familias químicas (Tabla 3), siendo los más abundantes hidrocarburos y aldehídos, estos últimos responsables de las notas herbáceas en productos vegetales como el nopal.

Tabla 3. Principales compuestos identificados en el nopal verdura variedad Milpa Alta envasado en atmósferas modificadas y almacenado a  $4 \pm 1$  °C.

Compuestos		Nota aromática	Ruta metabólica	Presente en nopal	
				Fresco	Almacenado
<b>hidrocarburos</b>					
2-metil buteno	2-metil 2 buteno			x	x
2-penteno	5-undeceno			x	x
Undecano	4-cloro 3-metil buteno			x	x
3-metil 4-metilene hexano		Vegetales		x	x
3,4-dihidro 2H pirano				x	x
2-etil furano					<b>x</b>
1,2-dimetil ciclopropano				x	x
4-metil 1,4-hexadieno				x	x
<b>aldehídos</b>					
Hexanal	2-heptenal		Lipoxigenasa	x	x
2,4-hexadienal		Verde,		x	x
2,6,6-trimetil carboxialdehído	1-ciclohexeno	herbácea		x	x
<b>terpenos</b>					
Limoneno			Terpenoides	x	x
<b>pirazinas</b>					
2-metoxi 3-(2-metilpropil) pirazina		Pimiento verde, vinos		x	x
<b>éster</b>					
Benzoato de etilo		Menta verde			<b>x</b>
<b>alcohol</b>					
4-metil ciclohexanol		Alcanfor		x	x
2-nonenol*		pepino	Lipoxigenasa	<b>x</b>	

\*Compuesto procedente del metabolismo de crasuláceas (Weckerle et al. 2001).

Dentro de los aldehídos se identificaron hexanal, 2,4-hexadienal y 2-heptenal, los cuales han sido reportados en tomate como responsables de notas frescas o herbáceas (Bai et al. 2011). En tuna, Arena et al. (2001) reportaron la presencia de hexanal en tres variedades evaluadas, mientras que Agozzino et al. (2005) sólo lo encontraron en la variedad blanca, inmediatamente después del pelado y en tuna fresca, pero no después de 24 h de almacenamiento, lo cual sugiere que el compuesto proviene de la degradación de lípidos por la vía de la lipoxigenasas (Sanz et al., 1997) y que el tiempo inhibe la capacidad de la fruta para sintetizar este volátil posiblemente debido a que los factores que regulan la expresión de las enzimas involucradas en esta ruta se modifican durante el almacenamiento. Dentro de los alcoholes, el 2-nonenol se encontró sólo en las muestras iniciales desapareciendo durante el almacenamiento. Weckerle et al. (2001) reportaron que este alcohol es un

compuesto típico del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), metabolismo presente en plantas como las cactáceas que crecen en condiciones de estrés hídrico y utilizan este mecanismo para fijar el CO<sub>2</sub> sin pérdidas apreciables de agua (Taiz and Zeiger, 2006). Probablemente la falta de luz durante el almacenamiento contribuyó a la desaparición de este volátil. Se ha reportado que el 2-nonenol se origina del ácido 9- hidroperoxi-linoleico y contribuye al 30% del olor en tuna (De Gregorio et al., 2010).

El limoneno detectado en todas las muestras de nopal es un volátil típico de los cítricos, el cual pudo ser sintetizado como respuesta al daño ocasionado por el desespinado ya que existen reportes de que en algunas plantas como *Arabidopsis thaliana*, se induce la producción de terpenos como respuesta a las condiciones de estrés (Huang et al. 2010). Otro de los compuestos identificados fue 2-metoxi 3-(2-metilpropil) pirazina el cual es un volátil típico de vinos y ha sido reportado como responsable de las notas herbáceas o vegetativas de los vinos Sauvignon Blanc y Cabernet Sauvignon (Allen et al., 1991).

Los volátiles con notas herbáceas hexanal y 2,4-hexadienal continuaron produciéndose durante todo el almacenamiento tanto en nopales control como en los almacenados en EAM, pero el 2-heptenal que también posee una nota herbácea o verde desapareció a los 20 días en los nopales conservados en EAM. Asimismo, se observó la aparición del benzoato de etilo en las muestras almacenadas en EAM. En grosella negra (*Ribes nigrum*) recién cosechada se sintetizó una alta cantidad de ésteres, los cuales cambiaron drásticamente cuando las frutas se almacenaron en atmósferas modificadas, en estas condiciones las grosellas sintetizaron nuevos ésteres como el benzoato de etilo (Harb et al. 2008). Otro compuesto que apareció durante el almacenamiento en las muestras de todos los tratamientos fue el 2-etil furano, cuya síntesis puede estar asociada al estado de desarrollo o envejecimiento del nopal. Narain et al. (2007) capturaron volátiles de la fruta caja-umbu (*Spondias* sp.) en dos estados de maduración encontrando que el 2-etil furano estuvo presente sólo en la fruta que ya se encontraba totalmente madura.

Finalmente, en otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se encontró una síntesis aumentada de etanol y acetaldehído en los nopales Milpa Alta conservados en atmósferas pasiva (aire) y activas (conteniendo N<sub>2</sub> y 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>) (Osorio y col.,

2011), mientras que en nopales de la var. Atlixco los niveles de ambos metabolitos de fermentación prácticamente no aumentaron (datos sin publicar).

## 7.6 CONCLUSIONES

En las muestras de nopal verdura var. Milpa Alta se identificaron los volátiles hexanal, 2,4-hexadienal, 2-heptenal y 2-nonenol los cuales pueden ser responsables de las notas herbáceas características de este producto. De estos volátiles sólo los dos primeros se produjeron durante todo el almacenamiento en los nopales control y almacenados en EAM, mientras que el 2-heptenal estuvo presente en los nopales conservados en EAM hasta los 20 días de almacenamiento y el 2-nonenol sólo se identificó en las muestras iniciales probablemente debido a que las condiciones de almacenamiento, particularmente la falta de luz, limitaron su síntesis. La presencia de limoneno se asoció al daño mecánico infringido al nopal durante la operación de desespinado, el benzoato de etilo apareció en respuesta a las atmósferas modificadas aplicadas y el 2-etil furano puede estar asociado al estado de desarrollo o envejecimiento del nopal. Lo anterior sugiere que los nopales Milpa Alta en EAM conservan la producción de la mayoría de los volátiles asociados a las notas herbáceas, pero que su perfil de olor puede verse modificado por la aparición de nuevos volátiles y por el aumento en la producción de metabolitos de fermentación.

## 7.7 REFERENCIAS

- Agozzino, P., Avellone, G., Ceraulo, L., Ferrugia, M., Filizzola, F., 2005. Volatile profiles of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) by SPME-CG/MS. Analysis. Ital. J. Food Sci. 3 (17), 341- 348.
- Allen, M.S., Lacey, M.J., Harris, L.N.R., Brown, W.V., 1991. Contribution of methoxypyrazine to Sauvignon blanc wine aroma. Am. J. Enol. Vitic. 42 (2), 109-112.
- Arena, E. Campisi, S., Fallico, B., Lanza, M.C., Maccarone, E., 2001. Aroma value of volatile compounds of prickly pear (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill. *Cactaceae*). Ital. J. Food Sci. 3 (13), 311-317.

Bai, J., Baldwin E.A., Imahori, Y., Kostenyuk, I., Burns, J., 2011. Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanism in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. Post. Biolo. Techn. 60, 111-120.

CODEX STAN 185, 1993. Norma del CODEX para el nopal.

[http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es)

Cantwell, M., Rodriguez-Felix, A., Robles-Contreras, F., 1992. Postharvest physiology of prickly pear cactus. Scientia Horticulturae 50, 1-9.

De Gregorio, A., Arena, N., Giuffrida, D., 2010. Lipoxygenase activity in prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Cactaceae). J. Food Biochem. 34, 439-450.

Flath, R.A., Takahashi, J.M., 1978. Volatile constituents of prickly pear (*Opuntia ficus indica* Mill., *de Castilla* Variety). J. Agric. Food Chem. 26 (4), 835-837.

Harb, J., Bisharat, R., Streif, J., 2008. Changes in volatiles constituents of blackcurrants (*Ribes nigrum* L. cv. 'Titania') following controlled atmosphere storage. Post. Biol. Techn. 47, 271-279.

Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., Tholl, D., 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among arabidopsis ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. Plant Physiol. 153, 1293-1310.

Narain, N., Galvão, M., Madruga, M.S., 2007. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (*Spondia* sp.) fruits during maturation. Food Chem. 102, 726 – 731.

- Osorio-Córdoba, J., Pelayo-Zaldívar, C., Verde-Calvo, J.R., Ponce-Valadez, M., Díaz de León-Sánchez, Bosquez-Molina, E., Rodríguez-Huezo, M.E., 2011. Conservación de nopal verdura 'milpa alta' (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10 (1), 93 – 104.
- Rodríguez, F.H., 2009. Cultivo orgánico del nopal. Trillas, México.
- Rodríguez-Felix, A., Cantwell, M., 1988. Developmental changes in composition and quality pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition* 38 (1), 83-93.
- Saltveit, M.E., 1998. Fresh cut product biology, in: Cantwell, M. (Eds.), *Maintaining Quality and Safety*, California, pp. 1-8.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. 831 Sinauer Associates Inc, Massachusetts, USA. 623 p.
- Sanz Carlos, Olías José M., Pérez Ana G. 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Tomás-Barberán F. A. and Robins R. J. (eds.) *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Clarendon Press-Oxford, England. Pp 125-155.
- Weckerle, B., Bastl-Borrmann, R., Richling, E., Hör, K., Ruff C., Schreier, P., 2001. Cactus pear (*Opuntia ficus indica*) flavour constituents - chiral evaluation (MDGC – MS) and isotope ratio (HRGC – IRMS) analysis. *Flavour Fragr. J.* 16, 360-363.

## **8. Artículo 3 EFECTO DEL ENVASADO EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS EN EL PERFIL SENSORIAL DEL AROMA Y EN LA ACTIVIDAD DE ALCOHOL DESHIDROGENASA EN DOS VARIEDADES DE NOPAL VERDURA**

J. Osorio-Córdoba<sup>1</sup>, C. Pelayo-Zaldívar<sup>1</sup>, J.R. Verde-Calvo<sup>1</sup>, M. Ponce-Valadez, H. Escalona-Buendía<sup>1</sup>, F. Díaz de León-Sánchez<sup>2</sup> y E. Bosquez-Molina<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, México D.F. CP 09340, México.

### **8.1 RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si los volátiles inducidos por las condiciones de estrés impuestas por el envasado en atmósfera modificada (EAM) alteran el perfil de olor y la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de las variedades Milpa Alta y Atlixco de nopal verdura desespinado. Se llevaron a cabo dos experimentos, en el primero se aplicaron aire y nitrógeno como atmósferas modificadas y se midió la actividad de la ADH, en el segundo sólo nitrógeno y se determinaron los perfiles sensoriales de los nopales almacenados; en ambos se cuantificaron metabolitos de fermentación. Los nopales de ambas variedades conservaron una buena apariencia después de 21 días de almacenamiento en el EAM conteniendo nitrógeno. La variedad Atlixco produjo concentraciones más bajas de acetaldehído y etanol a los 14 y 21 días de almacenamiento en aire y nitrógeno, y no generó olores indeseables, aunque el aroma típico a nopal se puede estar perdiendo como lo indicaron los valores bajos de intensidad en el descriptor manzana verde (hexanal) de los perfiles sensoriales determinados por los jueces entrenados. No se encontró una correlación entre la actividad de la (ADH) y la concentración de acetaldehído y etanol. Se concluyó que la variedad Atlixco mostró un mejor comportamiento que la variedad Milpa alta en el EAM a 4 °C con atmósfera de nitrógeno.



## 8.2 INTRODUCCIÓN

El nopal pertenece a la familia *Cactaceae*, género *Opuntia*. Este género es endémico de América y más de 377 especies han sido reconocidas, 104 crecen en zonas árida de México y 60 son endémicas del país (Anaya-Pérez, 2001). Antes de que el nopal entre a los canales de comercialización o sea adquirido por el consumidor se desespina y somete a un recorte de la orilla o rebordeado para darle forma (Corrales, 1996), recomendándose para su conservación temperaturas inferiores a 5 °C (Cantwell, 1995).

El metabolismo de la fermentación es estimulado en los productos vegetales por condiciones de estrés tanto externas (baja temperatura, heridas, atmósferas modificadas, etc.) como internas (senescencia) (Purvis, 2004; Toivonen, 2003, 2004; Wismer, 2003). El aumento en los niveles de acetaldehído y etanol puede tener un impacto negativo en el sabor si sus concentraciones rebasan los valores umbral de percepción sensorial (Ke et al., 1991) o si se induce la síntesis de otros compuestos odoríferos resultando con ello alterado el perfil original del olor. No existe información acerca del perfil sensorial de olor de las variedades de nopal verdura en fresco, ni por influencia del envasado en atmósferas modificadas (EAM). Pérez-Cacho et al., 2006 elaboraron un perfil sensorial para tres variedades de nopal escaldado, observando diferencias entre ellas en luminosidad y textura. En tuna, fruta de interés comercial producida por algunas especies de nopal, Del Nobile et al. (2009) determinaron el grado de aceptación del fruto después de aplicar tres tipos de recubrimientos (alginato de sodio, agar y gel de proteína a base de pescado) en dos tipos de envases (de una capa y multicapa), encontrando que al aplicar alginato de sodio la aceptabilidad del producto fue superior en los dos tipos de envases, la vida de almacenamiento se prolongó hasta por 13 días, se preservó la textura del producto y las características de color y olor se mantuvieron en niveles aceptables.

La manzana var. *Golden delicius* (*Malus domestica*) almacenada en una atmósfera de 0.05% O<sub>2</sub> y 0.2% CO<sub>2</sub> cambió su perfil de olor durante el almacenamiento debido a que produjo acetaldehído y etanol en altas concentraciones, los cuales se usaron como sustrato para la síntesis de otros compuestos volátiles no detectados en la muestra control (Mattheis

et al., 1991). En fresa var. *Camarosa*, Pelayo et al., 2007 evaluaron el efecto de una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> en la conservación de la calidad de esta fruta, encontrando que la acumulación de metabolitos de fermentación aumentó la síntesis de ésteres etílicos y otros volátiles provocando la pérdida del aroma original en el almacenamiento. Eun-Kyoung et al. (2007) estudiaron el efecto de EAM en el almacenamiento del champiñón *Pleurotus ostreatus* a 5 °C, detectando olores desagradables debidos al etanol y acetaldehído generados, los que se minimizaron al utilizar té verde y carbón activado dentro del empaque. Radomille de Santana et al. (2010) estudiaron el efecto de EAM en las características sensoriales del melocotón (*Prunus persica* L), encontrando un efecto positivo de los envases de polietileno de grosor medio (50-60 µm), los que permitieron conservar el aroma fresco y las características de calidad sin generar olores desagradables por efecto del tratamiento. En un estudio previo nuestro grupo de trabajo encontró un incremento en los metabolitos de fermentación en el nopal variedad Milpa Alta conservado a 4 °C en envases de atmósfera modificada conteniendo aire, nitrógeno y una mezcla de 5kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>, mientras que la calidad del nopal se pudo conservar hasta por 20 días en la atmósfera de nitrógeno (Osorio-Córdoba et al., 2011a).

El efecto de condiciones de estrés como la baja temperatura, heridas y el uso de EAM con concentraciones bajas de O<sub>2</sub> y elevadas de CO<sub>2</sub> inducen la producción de piruvato y su conversión posterior a diferentes productos como resultado de una alteración de las diversas rutas metabólicas (Kozlowski y Pallardy, 1997). Para disipar las altas concentraciones de piruvato opera de manera normal la ruta de fermentación etanólica donde el piruvato es convertido a acetaldehído en una reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa y después a etanol por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH); o bien, el piruvato puede ser convertido directamente a alanina por la acción de la alanina aminotransferasa (Purvis, 1997) o a acetil CoA por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Tadege et al., 1999).

De acuerdo con Kürsteiner et al. (2003) la fermentación etanólica puede ser visualizada como una ruta metabólica que participa en la transducción de señales de estrés ocasionado por factores del medio ambiente. Bajo condiciones de estrés los tejidos responden

incrementando la actividad de la ADH y por tanto la fermentación etanólica (Kato-Noguchi y Yasuda, 2007). En semillas de *Arabidopsis* y maíz, Kato-Noguchi (2001) encontró que la ADH fue inducida por atmósferas con bajos niveles de oxígeno, deshidratación y baja temperatura, además observó que el estrés por heridas incrementó la actividad de esta enzima en semillas de lechuga y maíz. Similarmente, la expresión de genes de ADH en semillas de arroz fue rápidamente inducida por baja temperatura (Kato-Noguchi y Yasuda, 2007). Como respuesta a las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y altas de CO<sub>2</sub>, Ke et al. (1994) encontraron un aumento en la actividad de la piruvato descarboxilasa (PDC) y ADH en camote, aguacate, pera y tomate. Hyodo et al. (1983), reportaron que el incremento en la actividad de la ADH es mayor en frutas posclimáticas que en preclimáticas, reportando que en plátano por efecto de la maduración se observa un marcado incremento en la actividad de la ADH seguido por un aumento en las concentraciones de etanol, manteniéndose este aumento hasta por 6 días de almacenamiento a 25 °C para después descender.

En Chile envasado en una atmósfera modificada conteniendo 0% de O<sub>2</sub> por 7 días a 20 °C se observó la acumulación tanto de acetaldehído como de etanol pero no se observó un aumento significativo en la actividad de ADH, pero cuando se le envasó con concentraciones de oxígeno de 1 y 3 % no se observó la acumulación de estos metabolitos de fermentación pero sí un incremento en la actividad de la enzima; indicando que la actividad de la ADH no necesariamente se correlaciona con las concentraciones de sus productos finales (Imahori et al., 2000). Asimismo, en dos variedades de fresa 'Jewel' y 'Cavendish' almacenadas bajo concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> no se observó una correlación entre la producción de acetaldehído y etanol y la actividad o expresión de genes de la ADH, por lo que se concluyó que algunos de los factores que pueden estar involucrados en el efecto del CO<sub>2</sub> en el metabolismo fermentativo son los cambios de pH, la concentración de los sustratos y cofactores o la síntesis de nuevas isoenzimas (Ponce-Valadez y Watkins, 2008). Similarmente, diferencias entre la acumulación de etanol y la actividad de PDC y ADH fueron reportadas en camote por Chang et al. (1982) y en peras por Ke et al. (1994). Por su parte, Roberts et al. (1989) encontraron que la tasa de producción de etanol estuvo correlacionada con la actividad de la ADH cuando los niveles de la enzima fueron muy bajos, pero cuando

su actividad fue alta la acumulación de etanol fue independiente de la actividad de la enzima. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los volátiles producidos por el proceso de fermentación inducido por las condiciones de estrés impuestas por el EAM modifican el perfil de olor de dos variedades de nopal y la actividad de la ADH, información que es relevante para conocer que variedad de nopal conserva mejor el perfil original de olor y ofrece las mejores condiciones para su almacenamiento en EAM y para profundizar en los mecanismos bioquímicos mediante los cuales esta tecnología altera el metabolismo del nopal.

### **8.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### *8.3.1 Material Biológico*

Se colectó nopal verdura (*Opuntia ficus indica* L.) variedad Milpa Alta de plantaciones comerciales ubicadas en Milpa Alta, México D.F (19°13'25" N; 99°01'47" O) y nopal orgánico variedad Atlixco en Otumba, Estado de México (19° 69'31" N; 98° 76'58" O). Los cladodios se cosecharon manualmente por la mañana (6-7 a.m.) y se transportaron en rejas plásticas al laboratorio.

#### *8.3.2 Aplicación de tratamientos y diseño experimental*

Los cladodios se seleccionaron por tamaño (20-25 cm de longitud), uniformidad de color y ausencia de defectos de acuerdo a la norma oficial de calidad (CODEX STAN 185, 1993), se desinfectaron con una solución de 200 ppm de cloro activo, se aleatorizaron y posteriormente se desespinaron y reborderaron. Se llevaron a cabo dos experimentos, en el primero se evaluaron dos variedades de nopal y dos atmósferas modificadas, las que en un estudio previo habían promovido la mayor y menor acumulación de metabolitos de fermentación (Osorio et al., 2011); y en el segundo, las mismas variedades de nopal pero sólo la atmósfera que conservó mejor la calidad de los nopales.

En el primer experimento se midió la actividad de la ADH, donde los cladodios sin espinas de las variedades Milpa alta y Atlixco, se colocaron en bolsas fabricadas con una película polysweat (Bolco D.F., México) permeable al O<sub>2</sub>, al CO<sub>2</sub> y al vapor de agua (260.6 g

O<sub>2</sub>/100 in<sup>2</sup>/24 h / 37.8 °C y 90% de H.R.; 6.58 g H<sub>2</sub>O/100 in<sup>2</sup>/24h a una atmósfera, 23 °C y 0% H.R.) de 35 micras de espesor. Los envases fueron primero sometidos a vacío utilizando una máquina empacadora TURBOVAC 420 ST (Países Bajos) el cual se liberó después con la aplicación de dos atmósferas: aire y nitrógeno. Los nopales envasados se almacenaron a 4 ± 1 °C. En el segundo experimento se realizó un análisis sensorial para el que se siguió un procedimiento similar, aplicándose una atmósfera de nitrógeno, manteniéndose las mismas condiciones de almacenamiento. En ambos experimentos la unidad experimental fue de cuatro nopales y tres repeticiones por tratamiento y el diseño experimental fue completamente al azar. Inmediatamente después de la cosecha y a los 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento se midió la actividad de la enzima, mientras que en el segundo experimento se les presentó a los jueces muestras que fueron almacenadas por 7, 14 y 21 días. En ambos experimentos se tomaron muestras para cuantificar metabolitos de fermentación en los mismos períodos ya indicados.

### *8.3.3 Análisis sensorial*

Las evaluaciones sensoriales fueron realizadas en las instalaciones especiales con que cuenta la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en la Ciudad de México (UAM-I) para este tipo de pruebas. Los cubículos están separados por paneles verticales para que 10 panelistas puedan evaluar al mismo tiempo, cuentan con luces rojas, las cuales se encendieron para iluminar cada cubículo cuando se necesitaba minimizar la influencia del color en la percepción del juez. Las muestras se presentaron a los jueces a través de puertas corredizas ubicadas entre el cuarto de preparación de muestras y cada cubículo.

#### *8.3.3.1 Entrenamiento del panel sensorial*

El reclutamiento y selección de jueces analíticos se realizó entre el personal del Departamento de Biotecnología de la UAM-I con base en los lineamientos de la norma ISO 8586-1:1993. El proceso consistió en una convocatoria con un cuestionario de preselección y en evaluar en los preseleccionados su habilidad para identificar y asociar sensaciones de olor, y para ordenar las intensidades de estímulos de interés. Los 11 panelistas

seleccionados, 3 hombres y 8 mujeres de entre 20 y 60 años, completaron un total de 40 h de entrenamiento para ser capaces de identificar los metabolitos de fermentación que se producen por efecto de condiciones de estrés como el acetaldehído y etanol además del hexanal, compuesto encontrado en la fracción volátil del nopal (Osorio-Córdoba et al., 2011b). Una vez seleccionado el grupo de jueces, se les entrenó en Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA) para consensar los descriptores de olor del nopal fresco (Stone and Siedel, 2004). En las primeras sesiones los jueces realizaron pruebas de identificación de sensaciones de olor (norma ISO, 1993), utilizándose soluciones en concentración umbral de vainillina (100 ppm), caproato de etilo (15 ppm), benzaldehído (15 ppm), acetaldehído (50 ppm) y etanol (50 ppm); también se corrieron estas pruebas sólo con dos de los compuestos de interés: acetaldehído a 50 y 200 ppm, etanol a 800 y 250,000 ppm y una mezcla de acetaldehído a 100 ppm y etanol a 400 ppm. Las concentraciones de metabolitos de fermentación utilizadas se basaron en los niveles mínimo y máximo de ambos compuestos encontrados por Osorio et al. (2011a) en nopales envasados en atmósferas modificadas. Dentro del proceso de entrenamiento se realizaron pruebas de ordenación (Pedrero y Pangborn, 1989; Meilgaard et al., 2007; norma ISO 8587, 2006) con diluciones acuosas de acetaldehído a 50, 100, 200 y 400 ppm; y una mezcla conteniendo una concentración constante de etanol a 1000 ppm y las concentraciones anteriormente mencionadas de acetaldehído. También se realizaron pruebas triangulares (Pedrero y Pangborn, 1989; ISO 4120, 1983) con nopal fresco de la variedad Milpa Alta colocado en bolsas polysweat con concentraciones añadidas de acetaldehído, etanol y hexanal. El etanol no se probó de manera aislada, ya que en las muestras evaluadas siempre se encontró en presencia de acetaldehído. Durante el proceso, los jueces generaron los siguientes descriptores: hierba dulce para acetaldehído, alcohol para etanol y manzana verde para hexanal. Posteriormente y una vez establecidos los descriptores y sus referencias, y como parte del entrenamiento, se realizaron pruebas donde los jueces evaluaron las intensidades de los compuestos de forma cuantitativa empleando una escala gráfica de 16 cm de acuerdo con la norma ISO 4121-2003.

### *8.3.3.2 Evaluación sensorial de muestras de nopal verdura*

En cada fecha de evaluación ( 7, 14 y 21 días de almacenamiento) se presentaron a los jueces muestras de los nopales almacenados en la atmósfera de nitrógeno y como referencia se les proporcionaron soluciones preparadas a partir de estándares comerciales de acetaldehído, etanol y hexanal, así como muestras de nopal fresco recién envasado en bolsas polysweat. Las muestras de nopal fueron codificadas con números aleatorios y seleccionadas completamente al azar para ser presentadas a los jueces. Cada juez evaluó los cambios en la intensidad de los tres compuestos de interés en el nopal fresco y almacenado inmediatamente después de abrir cada bolsa, empleando una escala gráfica de 16 cm con los marcadores ausente (0cm), medio (8cm) y muy intenso (16cm).

### *8.3.4 Actividad de alcohol deshidrogenasa*

Para la cuantificación de la actividad de la enzima ADH se maceraron 10 g de nopal en un mortero frío con nitrógeno líquido hasta lograr su pulverización y se pesaron 5 g de la muestra. Posteriormente, la muestra pulverizada se mezcló con 30 ml de una solución amortiguadora 1M (pH 6.5) que contenía ditiotreitól 5mM (Sigma Aldrich, USA) y polivinilpolipirrolidona 1% (p/v) (Sigma Aldrich, USA). El homogeneizado se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se usó como extracto enzimático. Para cuantificar la actividad de la enzima ADH se mezcló 1 mL del extracto de nopal, 1 mL del buffer de actividad (NAD<sup>+</sup> 1 mM en glicina 50 mM pH 9.6) y 1 mL de etanol 0.5 M, registrándose la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH a 340 nm por 3min en un espectrofotómetro Beckman, Modelo DU 7400 (Beckman Instruments, CA). La actividad de la enzima fue expresada en unidades de ADH, donde una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de NADH en 1 min. Para la determinación de la concentración de la proteína en la muestra se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976).

### *8.3.5 Cuantificación de metabolitos de fermentación*

Se obtuvieron extractos de nopal verdura mediante un extractor de jugos manual (Oster ®) de los dos experimentos realizados, los cuales se congelaron con nitrógeno líquido

y almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para la cuantificación de acetaldehído y etanol, se tomaron 6 g del extracto de nopal y se colocaron en un vial de vidrio de 30 mL conteniendo 3.6 g de NaCl para favorecer la liberación de los volátiles de la matriz al espacio de cabeza por un efecto de salting out (Harmon, 1997) y 9 mL de agua destilada, el vial se cubrió con un septo de vitón negro, se selló con un aro metálico y agitó en un vórtex Thermolyne 16700 mixer por 90 s. Para capturar y concentrar los metabolitos de fermentación del espacio de cabeza se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS), empleando una fibra de sílica de  $75\text{ }\mu$  de espesor recubierta con Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) (Supelco, Bellefonte, CA). La fibra se expuso por 10 min al espacio de cabeza, manteniendo el vial durante este periodo en incubación en un baño de agua a  $34 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La fibra se desorbió en un CG Varian 3900 (Varian, Palo Alto, C.A.) equipado con un detector de ionización de flama, utilizando una columna capilar HP-INNOWAX de 0.32 mm I.D.,  $0.25\text{ }\mu\text{m}$  y 60 m de longitud (Agilent Technologies, USA). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cual aumentó  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto hasta alcanzar  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  donde permaneció por 6 minutos. Los metabolitos de fermentación se identificaron comparando los tiempos de retención con los de compuestos estándar extraídos, concentrados y analizados con el mismo procedimiento analítico y las concentraciones se calcularon en base a curvas estándar utilizando diluciones acuosas de cada uno de los compuestos.

#### *8.3.6 Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows 4.0 (StatPoint Inc, Herdon, USA) aplicando ANOVA multifactorial para conocer si había diferencias significativas entre tratamientos en la actividad de la enzima e interacción con los días de almacenamiento. Cuando se detectaron diferencias significativas, se efectuó la comparación múltiple de medias por el método de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Los datos de la evaluación sensorial se sometieron a una prueba de t de datos pareados ( $\alpha= 0.05$ ) (O'Mahoney, 1985).



## 8.4 Resultados y Discusión

Como se indicó en los antecedentes, tanto en los nopales de la variedad Milpa Alta como los de la variedad Atlixco se ha inducido la producción de metabolitos de fermentación como respuesta a las condiciones de estrés a las que se han sometido los tejidos, encontrándose concentraciones variables tanto de acetaldehído como de etanol las cuales podrían modificar el perfil de olor del producto durante el almacenamiento.

En las pruebas de entrenamiento los jueces lograron identificar etanol sólo en concentraciones muy elevadas (250,000 ppm, similares a las que se encuentran en bebidas alcohólicas como el amaretto) y sólo cuando estuvo en presencia de acetaldehído, probablemente debido a que durante la fermentación alcohólica el etanol no se encuentra de forma aislada sino junto con el acetaldehído y es así como habitualmente se percibe (Purvis, 1997).

Los perfiles sensoriales de los nopales de la variedad Milpa (Fig. 10) indicaron a los siete días de almacenamiento que los valores de intensidad de los descriptores hierba dulce (acetaldehído) y manzana verde (hexanal) fueron significativamente más bajos en los nopales conservados en la atmósfera de nitrógeno que en los de la muestra fresca (Fig. 10 A). Este comportamiento fue corroborado con el análisis químico de los metabolitos de fermentación pues a los siete días en los nopales con nitrógeno el nivel de acetaldehído fue bajo (menos de 20 ppm) (Fig. 12 A). La muestra fresca probablemente exhibió niveles más altos de ambos como respuesta al estrés de la operación reciente de desespinado. La concentración de hexanal, que posee una nota herbácea y forma parte de los volátiles del nopal (Osorio-Córdoba et al., 2011b), pudo reducirse por efecto del almacenamiento. Diversos autores han indicado que el olor de las frutas en atmósfera modificada tiende a disminuir en el almacenamiento antes que la buena apariencia se pierda (Kader et al., 1978; Pelayo et al., 2003).

A los 14 días de almacenamiento (Fig. 10 B) el perfil de olor del nopal Milpa Alta fue similar en forma al de la muestra fresca, pero con valores de intensidad menores en todos los descriptores, lo que nos indica nuevamente que el perfil de olor se ve disminuido por efecto del EAM. Similarmente, en tomates almacenados en una atmósfera de nitrógeno a 6 °C por 35 h seguido por un periodo de 4-6 h de recuperación en aire se observó una disminución en compuestos volátiles C<sub>6</sub>, aunque hubo un aumento en las concentraciones de los metabolitos de fermentación (Boukobza and Taylor, 2002). A los 21 días de almacenamiento (Fig. 10 C), cuando el nopal aún conservaba características de calidad para ser comercializado, los valores de intensidad de los descriptores hierba dulce y etanol fueron significativamente más bajo y más alto, respectivamente, en la muestra almacenada que en la fresca. En concordancia con los resultados anteriores, el análisis químico indicó la presencia de niveles bajos de acetaldehído (un poco más de 20 ppm) y altos (más de 80 ppm) a los 14 y 21 días de almacenamiento, respectivamente en los nopales conservados en la atmósfera de nitrógeno (Fig. 12 A). No se encontraron diferencias significativas en el descriptor manzana verde a los 21 días de almacenamiento.

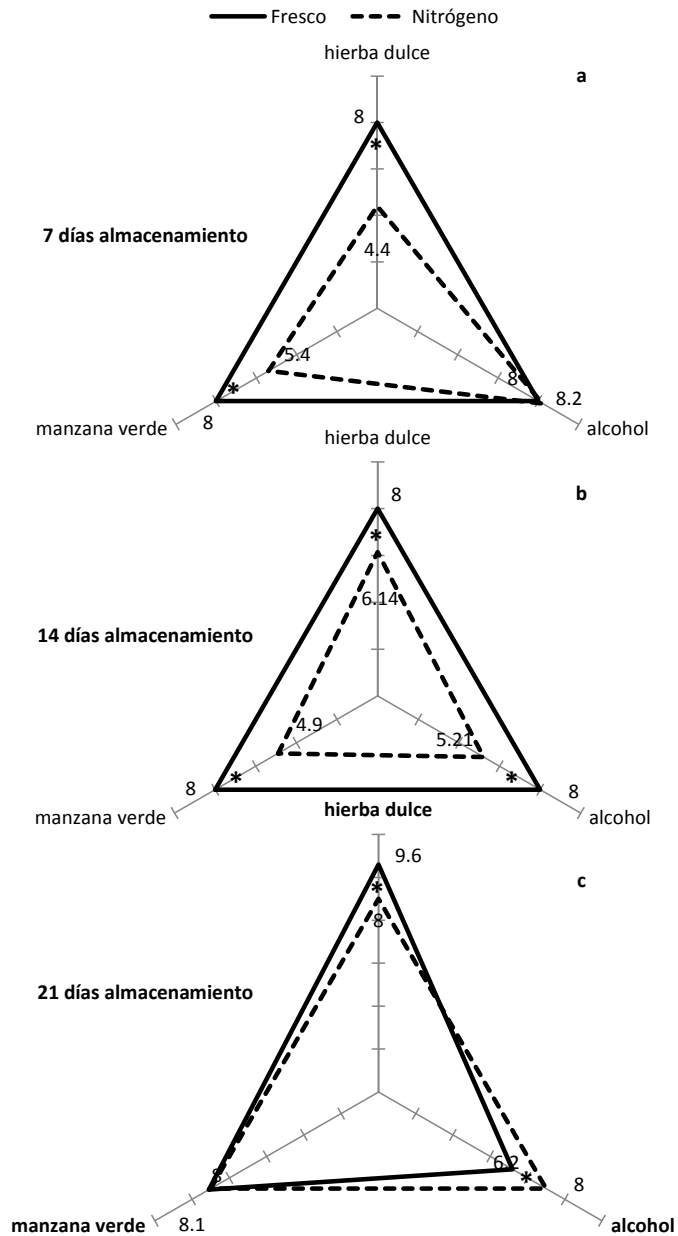


Figura 10. Cambios en el perfil sensorial de nopales variedad Milpa Alta en una atmósfera de Nitrógeno a 4°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de almacenamiento. En cada eje se grafica el valor promedio de intensidad de cada nota aromática percibida por los jueces. El símbolo (\*) denota las diferencias significativas en los valores de intensidad. Descriptores: hierba dulce-acetaldehído; alcohol-etanol; manzana verde-hexanal.

Los perfiles sensoriales durante el almacenamiento de la variedad Atlixco (Fig. 11) indicaron que los valores de intensidad de los descriptores evaluados fueron menores en la muestra conservada en nitrógeno que en la fresca en los tres períodos analizados, lo que indica una vez más que el perfil de olor se ve disminuido por efecto del EAM. A los 7 días (Fig. 11 A) los jueces sólo percibieron diferencias significativas en el descriptor hierba dulce posiblemente porque el acetaldehído se sintetiza en mayor cantidad en los nopales al principio del almacenamiento (Osorio-Córdoba et al., 2011a), pero a los 14 y 21 días percibieron diferencias en los tres descriptores. Durante el periodo de almacenamiento esta variedad no generó olores indeseables producto del metabolismo de fermentación, lo cual fue corroborado con las concentraciones bajas de acetaldehído y etanol detectadas a los 14 y 21 días de almacenamiento (Fig. 12 B), aunque el aroma se puede estar perdiendo como lo indican los valores bajos de intensidad en el descriptor manzana verde (hexanal).

Los nopales de ambas variedades conservaron una buena apariencia después de 21 días de almacenamiento en el EAM conteniendo nitrógeno. La vida postcosecha puede estar determinada más por el sabor que por la apariencia, debido a la pérdida de azúcar, ácidos, volátiles asociados al aroma y acumulación de productos provenientes del metabolismo de fermentación (Kader, 2008). Considerando los bajos niveles de acetaldehído y etanol encontrados en los nopales Atlixco almacenados en el EAM conteniendo nitrógeno, esta variedad puede ser considerada como mejor candidata para ser conservada con este tipo de tecnología.

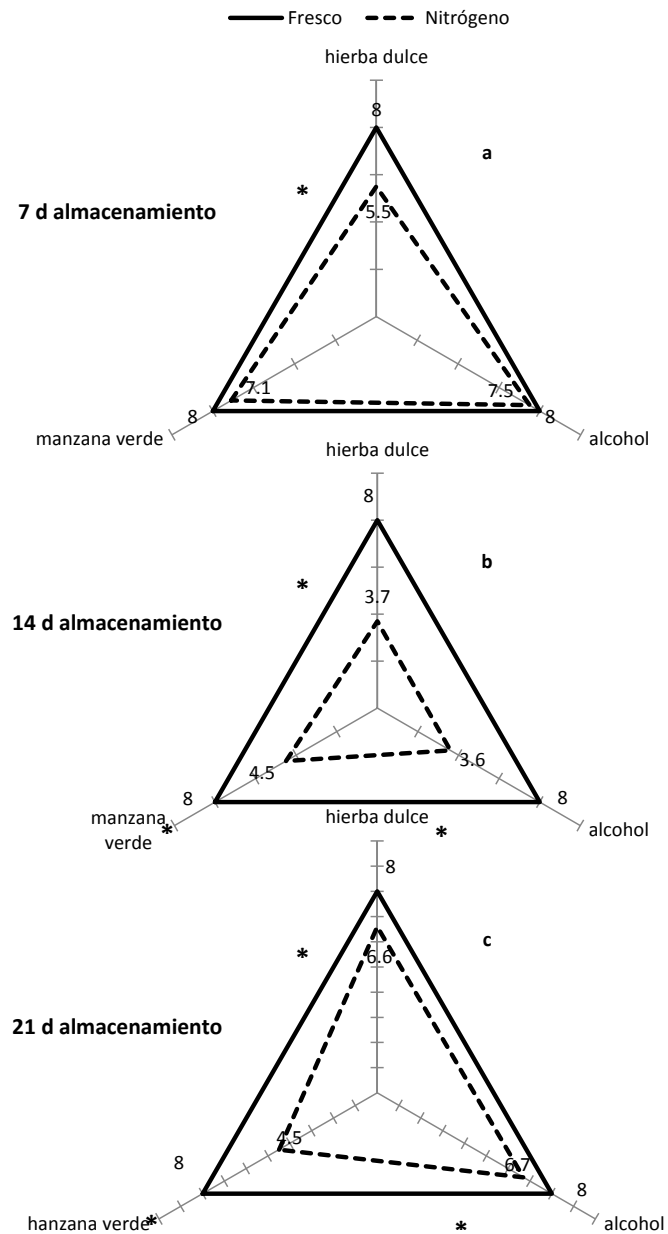


Figura11. Cambios en el perfil sensorial de nopales variedad Atlixco en una atmósfera de Nitrógeno a 4°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de almacenamiento. En cada eje se grafica el valor promedio de intensidad de cada nota aromática percibida por los jueces. El símbolo (\*) denota diferencias significativas en los valores de intensidad. Descriptores: hierba dulce-acetaldehído; alcohol-etanol; manzana verde-hexanal.

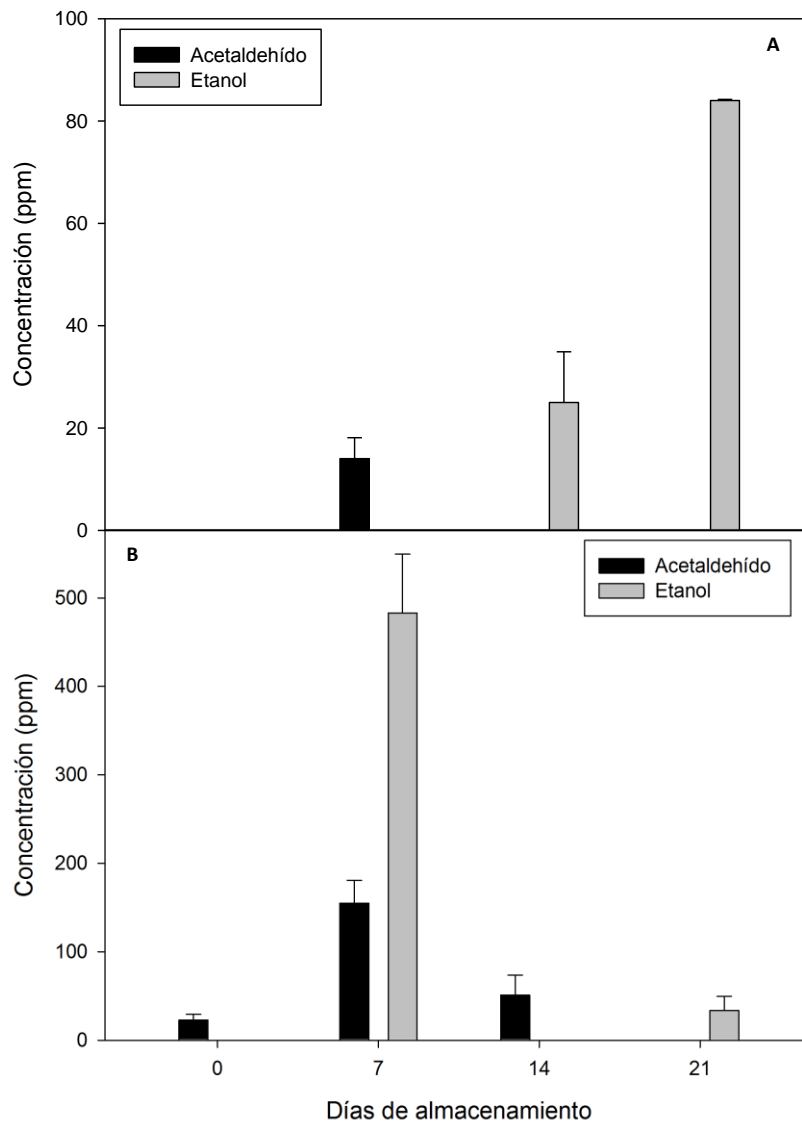


Figura 12. Metabolitos de fermentación en nopales almacenados a 4 °C en EAM de Nitrógeno evaluados junto con el perfil sensorial de cada variedad. Variedades 'Milpa Alta' (A) y Atlixco (B). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima ADH entre el nopal verdura 'Milpa alta' conservado en aire y nitrógeno, pero sí hubo cambios significativos a través del tiempo en los nopales de ambos tratamientos (Fig. 13 A). En los nopales en aire

no se detectaron cambios en la actividad de la enzima hasta los 14 días de almacenamiento, pero a los 21 días se observó un notable descenso. Contrario a lo esperado, en los nopales sólo se detectaron concentraciones traza de etanol durante el almacenamiento, mientras que el acetaldehído fluctuó entre 70 y 110 ppm durante los primeros 7 días (Fig. 13 B) para después desaparecer con el almacenamiento (datos no mostrados). Los resultados anteriores indican que la disipación del acetaldehído y la síntesis de etanol no pudo ser explicada con la actividad de la ADH encontrada, posiblemente debido a que esté operando otra ruta para disipar las concentraciones de acetaldehído generadas por la piruvato descarboxilasa. Tadege et al. (1999) reportaron como ruta alternativa el bypass de la piruvato deshidrogenasa (PDH) donde el acetaldehído es convertido a acetato por acción de la aldehído deshidrogenasa (ALDH), y es usado posteriormente en la biosíntesis de lípidos o convertido a acetil CoA por acción de la acetil CoA sintetasa. Se ha reportado que el incremento en la actividad de la ADH está relacionado directamente con un aumento en la síntesis proteica de esta enzima (Hyodo et al., 1983).

En los nopales almacenados en la atmósfera de nitrógeno se observó un comportamiento errático en la actividad de la ADH (Fig. 13 A), al inicio del almacenamiento la actividad descendió, a los 14 días incrementó y al final del experimento volvió a descender, encontrándose un ligero pero significativo descenso en la actividad de la enzima con respecto al valor inicial. Nuevamente sólo se encontraron trazas de etanol y el acetaldehído estuvo presente en aprox. 110 ppm sólo al inicio del almacenamiento, disipándose completamente de los tejidos por lo que no se hallaron ni trazas en fechas posteriores (Fig. 13 C). Existen reportes acerca de la acumulación de etanol en peras (Ke et al., 1994) y camote (Chang et al., 1982) y su relación con la actividad de las enzimas PDC y ADH, observándose que el aumento o disminución en la actividad de estas enzimas no guardan una relación con los productos finales del proceso. Como el etanol estuvo ausente, la ruta de la fermentación etanólica no podría explicar la disipación de las concentraciones de acetaldehído por lo que en este caso se puede proponer nuevamente la operación de la ruta del bypass de la PDH. Roberts et al., 1989, reportaron que la producción de etanol en raíces de maíz bajo hipoxia estuvo correlacionada con la actividad de la ADH cuando la enzima estuvo en niveles bajos, pero cuando estos niveles aumentaron la producción de etanol fue independiente de esta actividad.

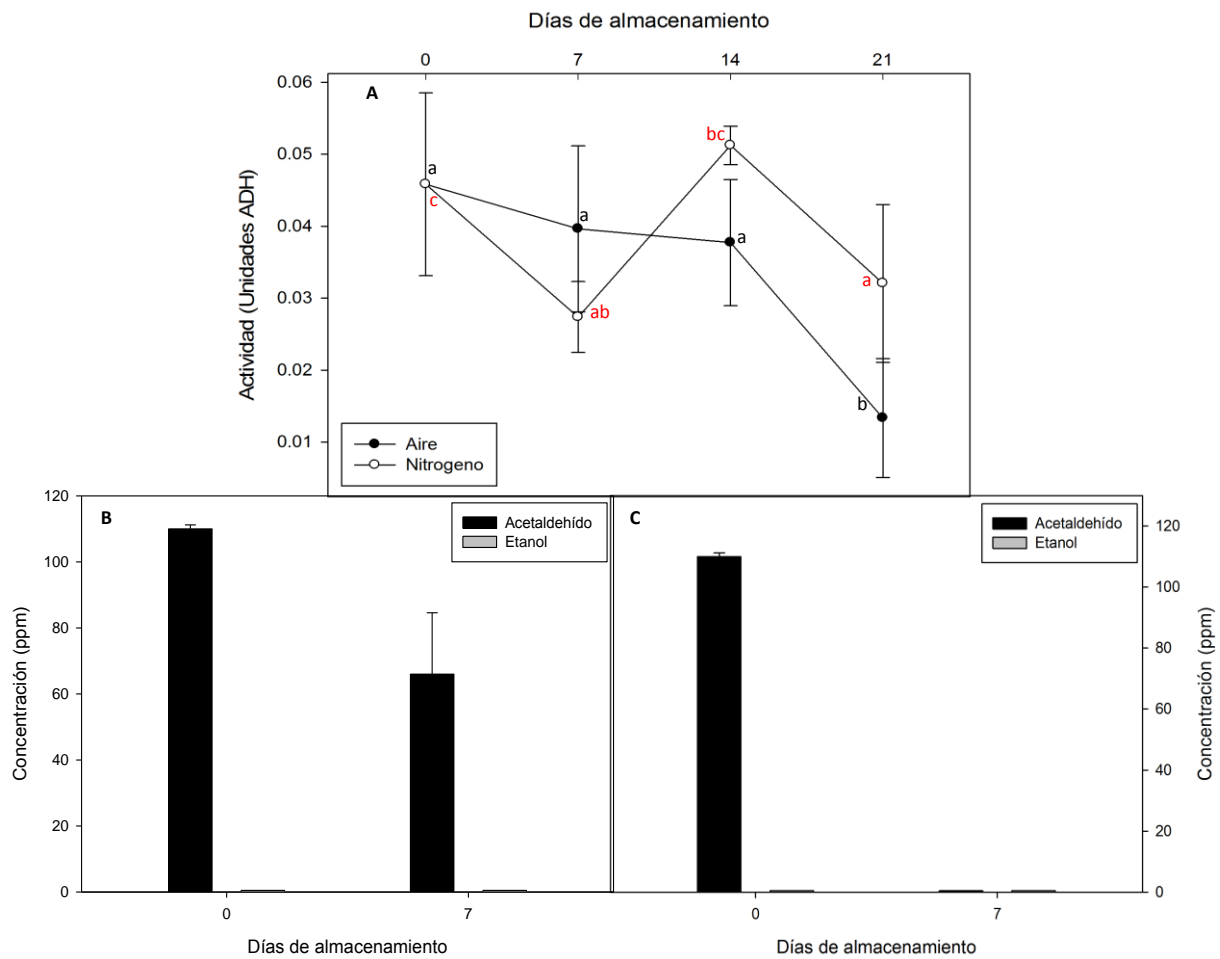


Figura 13. Actividad de la enzima ADH en nopal variedad Milpa Alta almacenado en EAM a 4 °C (A). Y metabolitos de fermentación en los mismos nopales conservados en aire (B) y nitrógeno (C). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

En cuanto a la variedad Atlixco tampoco se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima ADH entre los nopales conservados en aire y nitrógeno, pero sí entre fechas de almacenamiento. La actividad de la enzima ADH en los nopales conservados en aire (Fig. 14 A) se mantuvo estable durante los primeros 7 días para descender a los 14 y volver a ascender a los 21 días de almacenamiento. A diferencia de la variedad Milpa Alta, en los nopales Atlixco la cuantificación de los metabolitos de fermentación indicó una



relación entre al menos la detección de actividad de la ADH y la conversión de acetaldehído a etanol pues se cuantificaron niveles importantes del primero (100 ppm) al inicio del almacenamiento y del segundo (275 ppm) a los 7 días (Fig. 14 B). Durante este periodo la actividad de la enzima manifestó una tendencia al aumento, permitiendo la operación normal de la fermentación etanólica donde el acetaldehído es convertido a etanol a través de la ADH (Purvis, 1997). En los nopales almacenados en la atmósfera de nitrógeno sólo se observó un descenso significativo en la actividad de la ADH hasta los 14 días de almacenamiento (Fig. 14 A) y en cuanto a las concentraciones de acetaldehído y etanol (Fig. 14 C), se encontró un comportamiento similar al ya descrito para los nopales conservados en aire, excepto que las concentraciones detectadas fueron superiores (menos de 200 y más de 300 ppm, respectivamente) en esta variedad de nopal. Estos resultados indican que la ruta de la fermentación etanólica también está operando en los nopales Atlixco conservados en nitrógeno. En plátano, después de 2 días de almacenamiento a 25 °C la actividad de la ADH aumentó a una tasa muy rápida hasta los 6 días siguientes donde declinó, este aumento en la actividad precedió a la formación de etanol (Hyodo et al., 1983).

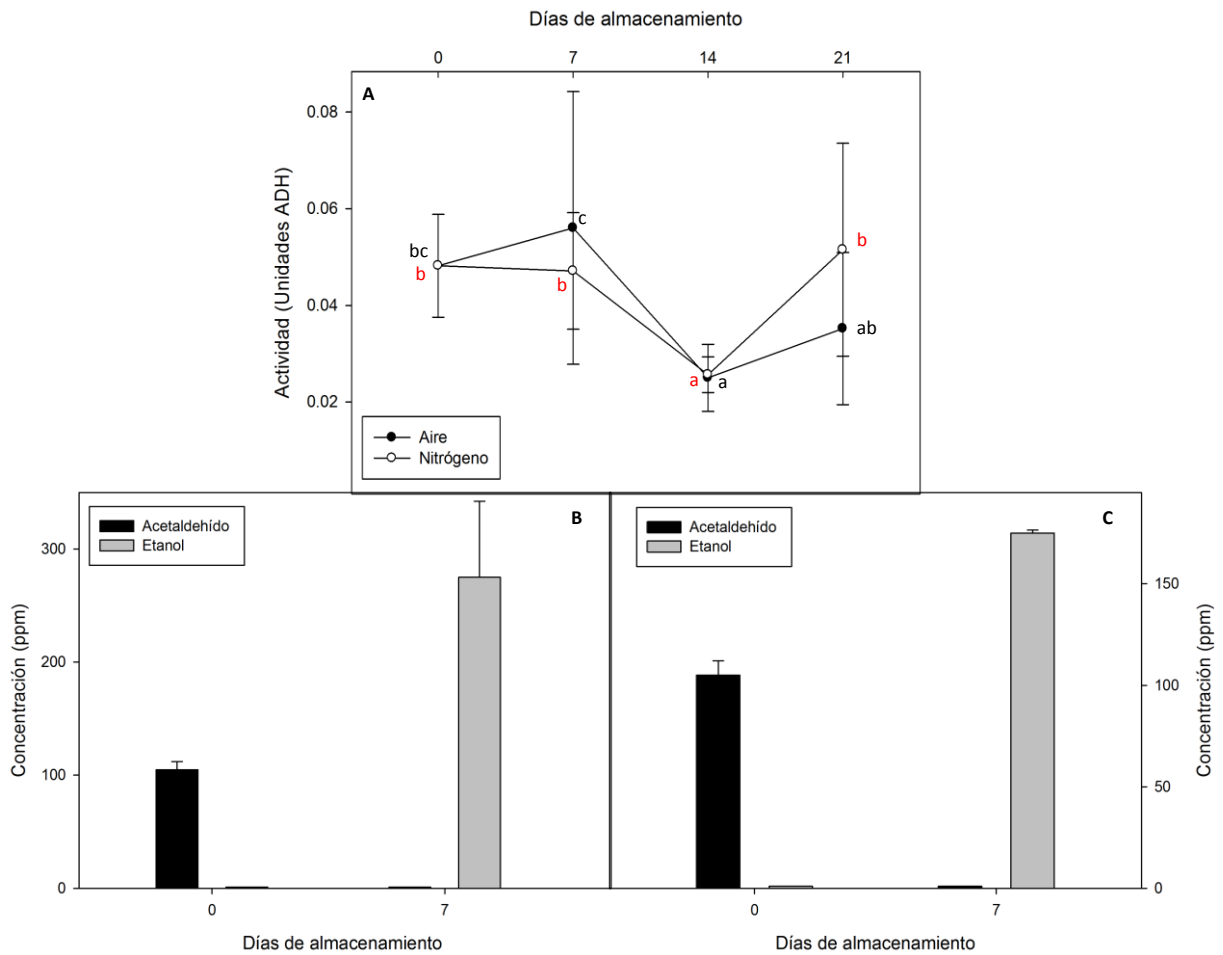


Figura 14. Actividad de la enzima ADH en nopal variedad Atlixco almacenado en EAM a 4 °C. (A). Y metabolitos de fermentación en los mismos nopales conservados en: aire (B) y nitrógeno (C). Los valores representan las medias de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

### 8.5. Conclusiones

Aunque las dos variedades estudiadas produjeron bajas concentraciones de metabolitos de fermentación, la variedad Atlixco mostró un mejor comportamiento que la variedad Milpa alta en el EAM a 4 °C con atmósfera de nitrógeno pues produjo concentraciones todavía más bajas de acetaldehído y etanol a los 14 y 21 días de almacenamiento, por lo que no generó olores indeseables, aunque el aroma típico a nopal se

puede estar perdiendo como lo indicaron los valores bajos de intensidad en el descriptor manzana verde (hexanal) en los mismos períodos de almacenamiento. Estos resultados indican que la variedad Atlixco ofrece mejor respuesta al EAM que la Milpa Alta. No se encontró relación entre la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y la concentración de acetaldehído y etanol. No se observó un aumento en la actividad de la ADH durante el almacenamiento de los nopales de ninguna de las dos variedades estudiadas en ninguna de las dos atmósferas aplicadas, aunque en la variedad Atlixco conservada en aire y nitrógeno se observó la conversión de acetaldehído a etanol y se registró actividad de la ADH, lo que sugiere que la ruta de la fermentación etanólica está operando. En cambio en la variedad Milpa Alta sólo se encontraron concentraciones de acetaldehído las cuales se disiparon de los tejidos sin que se produjera etanol, lo que sugiere que posiblemente esté operando la ruta del bypass de la piruvato deshidrogenasa (PDH).

## 8.6. Referencias

- Anaya-Perez, M.A. History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. In: Mondragón-Jacobo, C., Pérez-Gonzalez, S. (Eds.), *Cactus (Opuntia spp) as storage*. FAO, Rome, Italy, pp. 5-12.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Boukobza, F., Taylor, A.J. 2002. Effect of postharvest treatment on flavor volatiles of tomatoes. *Postharv. Biolo. Technol.* 25, 321-331.
- Bucher, M. and Kuhlemeier, C. 1993. Long-term anoxia tolerance. *Plant Physiol.* 103, 441-448.

- Cantwell, M., 1995. Post-harvest management of fruits and vegetable stems. In: Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant production and protection. FAO Rome Italy, 120-136 pp.
- Corrales-García, J. 1996. Acidity changes and pH buffering capacity of nopalitas (*Opuntia* spp.). *Postharvest Biology and Technology*, 32, 169–174.
- Chang, L., Hammet, K. L., Pharr, D.M. 1982. Ethanol, alcohol dehydrogenase, and pyruvate decarboxylase in storage roots of four sweet potato cultivars during simulated flood damage and storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 674-677.
- CODEX STAN 185 (1993). Norma del CODEX para el nopal. Disponible en:  
[http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es). Accesado: 20 septiembre 2010.
- Del Nobile, M. A., Conte, A., Scrocco, C. Brescia, I. 2009. New strategies for minimally processed cactus pear packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 356-362.
- Eun-Kyoung, L., Bong-Su, N., Gun-Hee, K. 2007. Minimization of off-flavor occurrence during the storage of modified atmosphere packaged *Pleurotus ostreatus*. *J. Food Sci. Nutr.* 12, 222-228.
- Harmon, A.D. 1997. Solid-Phase Microextraction for the analysis of flavors, p. 81-112. In: Marsili, R., (Eds). *Techniques For Analyzing Food Aroma*. Marcel Dekker, Inc, Nueva York.

- Hewett, E. W. 2006. An overview of preharvest factors influencing postharvest quality of horticultural products. *Int. J. Postharv. Technol. Innov.* 1 (1): 4-15.
- Hewett, E. N. 2000. Factors affecting apple aroma /flavor volatile concentrations: a review. *New Zealand journal of crop and Horticultural Science*, 28: 155 – 173.
- Hyodo, H., Ikeda, N., Nagatani, A., Tanaka, K. 1983. The increase in alcohol dehydrogenase activity and ethanol content during ripening of banana fruit. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 52(2): 196-199.
- Imahori, Y., Kota, M., Furukawa, H., Ueda, Y., Chachin, K. 2000. Ethanolic fermentation enzymes, their products and transcription of alcohol dehydrogenase from bell pepper fruit held under various low oxygen atmospheres. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 69 (3): 266-272.
- Kato-Nogushi, H. 2001. Wounding stress induces alcohol dehydrogenase in maize and lettuce seedlings. *Plant Growth Regulation* 35, 285-288.
- Kader, A.A. Morris, L.L., Stevens, M.A., Albright-Holton, M. 1978. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 103, 6-13.
- Kader, A. A. 1995. Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmosphere. *Acta Horticulturae* 398, 59-70.

- Kader, A. A. 2008. Perspective flavor quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1863-1868.
- Kato-Nogushi, H., Yasuda, Y. 2007. Effect of low temperature on Ethanolic fermentation in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 164, 1013-1018.
- Ke, D., Goldstein, L., O'Mahony, M., and Kader, A.A. 1991. Effects of short-term exposure to low O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub> atmospheres on quality attributes of strawberries. *J. Food Sci.* 56: 50–54.
- Ke, D. Mateos, M., Kader, A.A. 1993. Regulation of fermentative metabolism in fruits and vegetables by controlled atmosphere. In: *Proceedings from the 6th International Controlled Atmosphere Research conference.* Cornell University, Ithaca, NY pp 63-77.
- Ke, D., Zhou, L., Kader, A.A. 1994. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119 (5): 971-975.
- Ke, D., Yahia, E., Hess, B., Zhou, L., Kader, A.A. 1995. Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* 120 (3): 481-490.
- Kürsteiner, O., Dupuis, I., Kuhlemeier, C. 2003. The *Pyruvate decarboxylase1* Gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiol.* 132, 968-978.
- Kozlowski, T.T. y Pallardy, S.G. (1997). *Physiology of Woody Plants.* 2nd edition. Academic Press, New York. 411 p.

- Mattheis, J. P.; Buchanan, D.A.; Fellman, J.K. 1991. Changes in apple fruit volatiles after storing in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1602-1605.
- Meilgaard, M.C., Carr, B. T., Civille, G.V. 2007. *Sensory evaluation Techniques*. 4th edition. CRC Press, New York. 464 p.
- Osorio-Córdoba, J., Pelayo-Zaldívar, C., Verde-Calvo, J.R., Ponce-Valadez, M., Díaz de León-Sánchez, F., Bosquez-Molina, E. y Rodríguez-Huezo, Ma. E. 2011a. Conservación de nopal verdura 'Milpa Alta' (*Opuntia ficus indica* Mill.) desespinado en envases con atmósfera modificada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10 (1): 93-104.
- Osorio-Córdoba, J., Pelayo-Zaldívar, C., Bosques-Molina, E., Verde-Calvo, J. R. 2011b. Volátiles de nopal verdura conservado en atmósferas modificadas. *Nota Corta*, enviada a *Postharvest Biology and Technology*.
- O'Mahony M. 1995. *Sensory evaluation of food. Statistical methods and procedures*, Marcel Dekker, New York. USA. 487 p.
- Pelayo, C., Ebeler, S.E., Kader, A. A. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 °C in air or air + 20 kPa CO<sub>2</sub>. *Postharv. Biolo. Technol.* 27, 171-183.
- Pelayo-Zaldivar, C., Ben Abda, J., Ebeler, S.E., Kader, A.A. 2007. Quality and chemical changes associated with flavor of 'Camarosa' strawberries in response to a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. *HortScience*, 42 (2): 299-303.

- Pérez-Cacho, M.P; Galán-Soldevilla, H., Corrales-García, J. Hernández, A. 2006. Sensory characterization of nopalitos (*Opuntia* spp.). *Food Research International* 39, 285-193.
- Pedrero, D. L.; Pangborn, R. M. 1989. Evaluación sensorial de alimentos. Métodos nalíticos. Ed. Alhambra, México. 130 p.
- Pelayo-Zaldívar, C. 2010. Environmental effects on flavor changes. In: Handbook of fruit and vegetable flavors, (Hui Y.H., Chen Feng and Nollet L.M.L. Eds.). Editorial John Wiley and Sons, Inc., E.U.A., pp. 73-91.
- Plestenjak, A., Požrl, T., Hribar, J., Unuk, T., Vidrih, R. 2008. Regulation of metabolic changes in shredded cabbage by modified atmosphere packaging. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (4): 427-433.
- Ponce-Valadez, M. y Watkins, C.B. 2008. Fermentation and malate metabolism in response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations in two strawberry cultivars. *Physiologia Plantarum* 134: 121-133.
- Purvis, A.C. 1997. The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. *HortScience* 32 (7): 1165-1168.
- Purvis, A. C. 2004. Regulation of Oxidative Stress in Horticultural Crops. *HortScience*. 39 (5), 930-932.



- Radomille de Santana, L.R., Benedetti, B.C., Sigrist, J.M.M. 2010. Sensory characteristics of 'Douradão' peaches submitted to modified atmosphere packaging. *Rev. Bras. Frutic*, 32 (3): 700-708.
- Roberts, J. K., Chang, K., Webster, C., Callis, J., Walbot, V. 1989. Dependence of Ethanol fermentation cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. *Plant Physiol.* 89, 1275-1278.
- Stone, H. and Joel L. Sidel. 2004. *Sensory Evaluation Practices*. Academic Press, New York. 250p.
- Tadege, M., Dupuis, I., Kuhlemeier, C. 1999. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science*, 4 (8): 320-325.
- Toivonen, P. M. A. 2003. Effects of storage conditions and postharvest procedures on oxidative stress in fruits and vegetables. In: Hodges, D.M. (Eds.). *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. Food Products Press, New York pp. 225-246.
- Toivonen, P. M. 2004. Postharvest Storage Procedures and Oxidative Stress. *HortScience* 39 (5), 938- 942.
- Wismer, W. V. 2003. Low temperature as a causative agent of oxidative stress in postharvest crops. In: Hodges, D.M. (Eds.) *Postharvest oxidative stress in horticultural crops*. Food Products Press, New York. p. 55-68.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

- El uso de envases con atmósferas modificadas (EAM) permitió conservar las características de calidad de los nopales almacenados extendiendo la vida postcosecha del producto a 15 días en los nopales de la variedad Atlixco y hasta por 20 días en los de la variedad Milpa Alta.
- Las concentraciones de metabolitos de fermentación en las dos variedades estudiadas estuvo influenciada por la época de corte y las prácticas agrícolas realizadas en cada temporada de producción.
- Las dos variedades de nopal verdura estudiadas mostraron un comportamiento diferente durante el almacenamiento como respuesta a las condiciones de estrés. El tipo de daño observado no fue comparable entre ellas ya que en la variedad Milpa Alta se observó oscurecimiento de las zonas desespinaadas probablemente debido a oxidación enzimática o a un proceso de reparación de tejidos, mientras que en la variedad Atlixco se observó picado e hidrosis en el tejido sano como respuesta al daño por frío.
- De las atmósferas evaluadas (aire, nitrógeno y una mezcla de 5 kPa O<sub>2</sub> + 4 kPa CO<sub>2</sub>) la que contenía nitrógeno permitió conservar mejor los atributos de calidad, evitó las pérdidas excesivas de peso por transpiración y retrasó la aparición del oscurecimiento y de los síntomas de daño por frío, además de mantener bajas las concentraciones de metabolitos de fermentación en los tejidos. Esto pudo deberse a que con niveles mínimos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> los procesos de respiración y fotosíntesis son reducidos al mínimo ya que los tejidos no disponen de estos sustratos para seguir operando estas rutas metabólicas. Caso contrario a lo observado con las otras dos atmósferas evaluadas, ya que con disponibilidad tanto de O<sub>2</sub> como de CO<sub>2</sub> los tejidos operan las rutas de forma normal hasta agotar la disponibilidad de estos sustratos, por lo que el proceso de envejecimiento continúa.

- La variedad Atlixco mostró un mejor comportamiento durante el almacenamiento en EAM. El uso de una atmósfera que contenía nitrógeno permitió conservar los atributos de calidad en los nopales de esta variedad. El daño por frío apareció en los tejidos hasta después de 15 días de almacenamiento, se observó un color verde más intenso, mayor acidez y firmeza lo que hace de este cultivar un buen candidato para ser almacenado con esta tecnología de conservación.
- Durante el almacenamiento en la atmósfera de nitrógeno, los nopales 'Atlixco' mantuvieron niveles bajos de metabolitos de fermentación, los cuales se disiparon con el transcurso del tiempo, encontrándose concentraciones bajas de estos compuestos al final del almacenamiento.
- Se identificaron más de 80 volátiles en las muestras de nopal verdura variedad Milpa Alta tanto fresco como almacenado, de los cuales, sólo 4 pueden estar asociados con las notas verdes del producto y algunos pueden estar asociados a la respuesta de los tejidos a la acción del desespinado y como un indicador del estado de desarrollo o envejecimiento de los tejidos. En los nopales de esta variedad, el perfil de olor puede verse modificado por la aparición de nuevos volátiles y por el aumento en la producción de metabolitos de fermentación.
- En los nopales de la variedad Atlixco no se modificó el perfil de olor en respuesta a las condiciones de estrés por baja temperatura, heridas por el desespinado y rebordeado y uso de EAM, mostrando valores de intensidad bajos para los descriptores evaluados pero con un perfil similar en forma al de una muestra fresca.
- No se observaron aumentos significativos en la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en la variedad Atlixco, pero los ligeros cambios que se presentaron permitieron explicar la forma en que se disiparon los metabolitos de fermentación en los tejidos durante el almacenamiento, concluyéndose que en esta variedad y bajo estas condiciones de almacenamiento está operando la ruta de la fermentación etanólica.

## **10. Recomendaciones y perspectivas**

En México, las variedades Milpa Alta y Atlixco son las más importantes por las áreas sembradas, además de ser las preferidas por los consumidores por su sabor. La variedad Atlixco tuvo un mejor comportamiento cuando se almacenó en Envases con Atmósferas Modificadas (EAM) ya que mantuvo bajos los niveles de metabolitos de fermentación, los cuales se inducen como respuesta a las diferentes condiciones de estrés. De las atmósferas evaluadas la que contenía nitrógeno permitió que esta variedad conservara de mejor forma los atributos de calidad y que no se modificara el perfil de olor durante el almacenamiento por las concentraciones de acetaldehído y etanol generadas dentro del envase, además de que prolongó la vida de almacenamiento hasta por 15 días, observándose a partir de esta fecha síntomas de daño por frío.

Esta técnica poscosecha es una alternativa para ser empleada por los agricultores que siembran esta variedad, ya que permite prolongar la vida de almacenamiento, pudiendo ser comercializado este producto en mercados distantes a la zona de producción o bien ser exportados a zonas donde sea demandado. Es necesario realizar una prueba piloto para conocer el comportamiento de esta variedad bajo condiciones de comercialización.

## 11. Referencias

- Callejas-Juárez, N., Matus-Gardea, J.A., García Salazar, J.A., M.A. Martínez-Damián, Salas-González J.M. 2006. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, nopalito y derivados en el Estado de México. *Agrociencia* 43:73-82.
- Cantwell, M. 1995. Post-Harvest management of fruits and vegetable stems. En: *Agroecology, cultivation and uses of cactus pear*, Paper 132 (Barbera, G., Inglese, P., Pimienta- Barrios, E.), Pp. 120-141. Editorial FAO Plant Production and Protection, Roma.
- Corrales-Garcia, J. 1996. Acidity changes and pH buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp). *Postharvest. Biology. and Technology* 32: 169–174.
- Corrales-García, J. y Flores-Valdez, C.A. 2003. Nopalitos y tunas: producción, comercialización, poscosecha e industrialización. CIESTAAM- Programa Nopal, Universidad Autónoma de Chapingo México.
- Hernández-Zaragoza, J.B., Caballero-Badillo, C.E., Rosas-Juarez, A., López-Lara, T., Hinojosa-Torres, J. y Castaño, V.M. 2007. Modification of Portland cement mortars with cactus gum. *Chemistry and chemical Technology* 1(3): 175-177.
- INE, 2007. Instituto Nacional de Ecología. El nopal verdura.  
<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/71/nverdura.html>. Accesado: Junio 2011.
- Kader, A. A. 1986. Biochemical and physiological bases for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40(5): 99-104.

- Kader, A. A. 1995. Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmosphere. *Acta Horticulturae* 398: 59-70.
- Kader, A. A. 2002. Modified Atmospheres during transport and storage, p.135-144. In: Kader, A.A. (ed.). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 3<sup>rd</sup> Ed. Univ. California Agric. Natural Resources, Oakland, C.A.
- Kato-Nagushi, H. y Yasuda, Y. 2007. Effect of low temperature on ethanolic fermentation in rice seedlings. *Journal Plant Physiology* 164 (8): 1013-1018.
- Ke, D., Zhou, L., Kader, A.A. 1994. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *Journal American Society Horticultural Science* 119 (5): 971-975.
- Nerd, A., Dumoutier, M. y Mizrahi, Y. 1997. Properties and postharvest behavior of the vegetable cactus *Nopalea cochenillifera*. *Postharvest Biology and Technology* 10 (2): 135 -143.
- Pérez-Cacho, M.P; Galán-Soldevilla, H., Corrales-García, J. Hernández, A. 2006. Sensory characterization of nopalitos (*Opuntia* spp.). *Food Research International* 39: 285-193.
- Purvis, A. C. 2004. Regulation of oxidative stress in horticultural crops. *HortScience*. 39: 930-932.

- Ramayo-Ramírez, L., Saucedo-Veloz, C. y Lakshminarayana, S. 1978. Prolongación de la vida de almacenamiento del nopal hortaliza (*Opuntia inermis* Coulter) por refrigeración. Chapingo, Nueva Época 10: 30-32.
- Rodríguez-Felix, A., Cantwell, M., 1988. Developmental changes in composition and quality pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition* 38 (1): 83-93.
- Sandhya, 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. *LWT – Food Science and Technology* 43: 381-392.
- SIAP, 2011. Estacionalidad de nopalitos. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>. Accesado: Junio 2011.
- Stintzing, F.C. y Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (2): 175 - 194.
- Zagory, D. y Kader, A. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh product. *Food Technology* 4 (1): 70-86.