



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**INHIBICIÓN DEL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO
EN NOPALES FRESCOS DESESPINADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AGUILAR LEDESMA DAMIÁN



MÉXICO, D.F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	PROF. RAÚL AGUILAR CABALLERO
Vocal	PROF. HERMILO LEAL LARA
Secretario	PROF. ARTURO NAVARRO OCAÑA
1er suplente	PROF. LUIS ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR
2do suplente	PROFRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 321, CONJUNTO E

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA
Asesor del tema

NORA GUTIÉRREZ NÁJERA
Supervisora técnica del tema

DAMIÁN AGUILAR LEDESMA
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme finalizar esta etapa de mi vida

A la UNAM

Por abrirme las puertas y dejarme ser uno de los suyos

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña

Por la confianza que ha depositado en mi para realizar este proyecto, por sus consejos y enseñanzas.

A Nora Gutiérrez Nájera

Por su tiempo dedicado al apoyo de esta tesis así como por sus recomendaciones y consejos.

A mis compañeros del laboratorio 321

Quienes me han regalado muy buenos momentos y me han impulsado a finalizar esta gran meta.

A mis profesores de la carrera y a cada una de las personas que han impulsado este objetivo.

A mis compañeros y amigos de Sigma por su comprensión y apoyo.

DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme cumplir este sueño.

A mis padres: Lucila y Gerónimo,

Quienes siempre han estado a mi lado brindándome apoyo, consejos, tiempo y cariño. Son un excelentes personas dignas de admirar e imitar. Ahora hemos concluido esta gran meta que ustedes iniciaron hace ya tiempo al llevarme a aquel jardín de niños y que no hubiera podido lograr sin ustedes.

A mis hermanos: Diana y Heberto,

Quienes me han apoyado en todos los momentos, buenos y malos, cada uno ha sido un ejemplo a seguir.

A María Fernanda

Por tu apoyo en la culminación de este trabajo, por tu comprensión, tiempo, amistad y cariño.

Gracias por ser una motivación más en mi vida.

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad, especialmente a “La Comarca” por los buenos y no tan buenos momentos que hemos vivido, por el granito de arena que cada uno colocó para construir este sueño.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVO GENERAL	3
4. ANTECEDENTES	3
4.1 Generalidades del nopal	3
4.1.1 Morfología fisiología del nopal (planta)	4
4.1.2 Usos tradicionales	7
4.1.3 Aporte nutrimental del nopal	8
4.1.4 Zonas de producción del nopal verdura	10
4.1.5 Variedades de cultivo	12
4.1.6 Cosecha del nopal	13
4.1.7 Mercado internacional del nopal	16
4.2 Pardeamiento enzimático	17
4.2.1 Definición	17
4.2.2 Tipos de pardeamiento	19
4.2.3 Enzimas causantes del pardeamiento enzimático	20
4.2.3.1 La polifenoloxidasa (PPO)	20
4.2.3.2 La peroxidasa (PO)	23
4.2.4 Características secundarias del pardeamiento enzimático	27
4.2.5 Inhibidores del pardeamiento enzimático	28
4.3 Nopal desespinado	32

4.3.1 Características generales	32
4.3.2 Procesamiento y Transformación Industrial del nopal verdura	32
4.3.2.1 Productos de la industria alimentaria tradicional y tecnificada .	32
4.3.2.1.1 Nopal verdura fresco con espinas	32
4.3.2.1.2 Nopal verdura desespinado	32
4.3.2.1.3 Nopal verdura en salmuera o en escabeche	33
4.3.2.1.4 Mermelada de nopal verdura	34
4.3.2.1.5 Nopal verdura precocido y congelado	35
4.3.2.2 Productos medicinales	35
4.3.3 Problemas que se presentan en los productos del nopal	35
4.3.3.1 En relación al desespinado	35
4.3.3.2 En relación a la elaboración de productos de la industria alimentaria	36
4.3.4 Normas de calidad del nopal verdura	37
4.3.5 Estudios previos para la conservación del nopal fresco	38
5. METODOLOGÍA	40
5.1 Diagrama general de la investigación	40
5.2 Descripción de la metodología	42
5.2.1 PRIMERA PARTE	42
5.2.1.1 Obtención del extracto	42
5.2.1.1.1 <i>Precipitación de proteínas con Acetona fría</i>	43
5.2.1.1.2 <i>Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio (1</i>	

<i>precipitación directa</i>)	43
5.2.1.1.3 <i>Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio (2</i> <i>precipitaciones</i>)	44
5.2.1.2 Determinación de proteína	44
5.2.1.3 Determinación de la actividad enzimática	45
5.2.1.3.1 Ensayo del catecol para PPO	45
5.2.1.3.2 Ensayo de guayacol para PO	45
5.2.2 SEGUNDA PARTE	46
5.2.2.1 Pruebas de inhibición	46
5.2.2.2 Vida de anaquel de los nopales frescos desespinaados	47
6. MATERIALES Y EQUIPOS	48
6.1 Material Biológico	48
6.2 Material Químico	48
6.3 Equipo	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
7.1 Resultados de la primera parte	49
7.2 Resultados de la segunda parte	57
8. CONCLUSIONES	68
9. ANEXOS	69
9.1 Norma Oficial Mexicana para el Nopal	69
9.2 Norma Codex para el Nopal	80
10. BIBLIOGRAFÍA	87

2. INTRODUCCIÓN

El pardeamiento enzimático es el fenómeno de oscurecimiento que, en presencia de oxígeno o peróxidos, afecta a algunas frutas y verduras cuando sufren algún daño mecánico (por ejemplo cortar o golpear el tejido). La causa de este oscurecimiento es la presencia de oxidoreductasas, entre las cuales están la polifenoloxidasas (PPO) y la peroxidasa (PO) principalmente. La importancia de estas enzimas radica en que catalizan el oscurecimiento de los alimentos cuando son procesados en fresco, tal es el caso del nopal verdura cuando es desespinado ya que solamente mantiene el color verde característico unas pocas horas después de haber sido procesado mecánicamente disminuyendo así las propiedades organolépticas y por lo tanto la calidad del producto final. Por tal motivo se afecta de manera importante la preferencia del consumidor y la economía de los productores. Este trabajo propone el uso de inhibidores que retarden el pardeamiento enzimático de los nopales frescos desespinaados para facilitar la comercialización del producto mínimamente procesado.

3. OBJETIVO GENERAL

Buscar un inhibidor del oscurecimiento del nopal desespinado causado por las enzimas polifenoloxidasas o peroxidasas o ambas.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades del nopal

Los nopales han sido una fuente alimenticia en México por cientos de años. Como vegetal en el caso de las pencas y como fruta en el caso de las tunas. Como vegetal se puede preparar en ensaladas, en sopa, guisado, asados y en fin, en una amplia gama de aplicaciones. La fruta se emplea principalmente en dulces y jaleas (www.giga.com, 2004).

El nopal pertenece al género “*Opuntia*” y se puede decir que todas las especies que pertenecen a este género, son comestibles desde el momento en que son no tóxicas. Sin embargo, hay algunas especies que son más fáciles de utilizar que otras, debido básicamente al contenido de espinas (Heid, 1963).

Las especies silvestres tienen mayor contenido de espinas porque es el medio por el que el nopal pierde menos agua debido a que su hábitat natural son zonas desérticas, en cambio, el nopal que se cultiva con fines alimentarios es cuidado por sistemas de riego o cultivado en zonas poco desérticas por lo que la planta no necesita desarrollar gran cantidad de espinas como las especies silvestres (Flores, 1995).

De las más de 100 especies de *Opuntia* que existen en México, se utilizan para forraje 15 especies, 5 para fruta y 3 para Verdura (www.giga.com, 2004).

4.1.1 Morfología y fisiología del nopal verdura

Opuntia Ficus-Indica es un vegetal arborescente de 3 a 5 metros de alto, su tronco es leñoso y mide de 20 a 50 cm de diámetro. Forma “pencas o cladodios” de 30 a 60 cm de largo por 20 a 40 cm de ancho y de 2 a 3 cm de espesor. Sus ramas están formadas por pencas de color verde opaco con areolas que contienen espinas más o menos numerosas, produce flores de 7 a 10

cm de largo, su fruto es oval de 5 a 10 cm de largo por 4 a 8 cm de diámetro y su color puede ser amarillo, anaranjado, rojo o purpúreo con abundante pulpa carnosa y dulce.

En terrenos apropiados, con pH neutro y sin problemas de plagas el nopal puede llegar a vivir hasta 80 años. Las plantaciones comerciales de explotaciones intensivas, llegan a durar 3 años (www.giga.com, 2004).

Morfología del nopal

El **sistema radicular** es perenne, extenso y superficial. Las raicillas secundarias están provistas de pelos absorbentes, caducas, ya que su presencia se limita a la época de lluvias. Su estructura y funcionamiento le permite captar con eficiencia la mayor cantidad de agua durante los breves períodos de lluvias.

Los **cladodios** son las pencas del nopal, de forma plana. Cuando estos están tiernos son muy suculentos y poco lignificados, transforman la luz en energía química a través de la fotosíntesis, están recubiertos por una cutícula del tipo lipídica, interrumpida por la presencia de los estomas, mismos que permanecen cerrados durante el día.

Las **flores** son diurnas, solitarias, nacen en la base de los árboles que funcionan indistintamente como yemas florales o vegetativas. Presentan colores vivos y brillantes. La apertura de la flor tarda en promedio 55 días después de la aparición de las yemas florales. La flor permanece abierta durante 24 horas. Se considera que el momento de anthesis, es decir, el punto exacto a partir del cual se empieza a contar la vida del fruto, es a los dos días, después de la apertura de la flor.

El **fruto** es una baya ovoide, cilíndrica, de diversos colores, ubicada en el extremo superior (cicatriz floral), pericarpio correoso, con numerosos colchones de ahuates distribuidos en tresbolillo, semillas de color variable (www.giga.com, 2004).

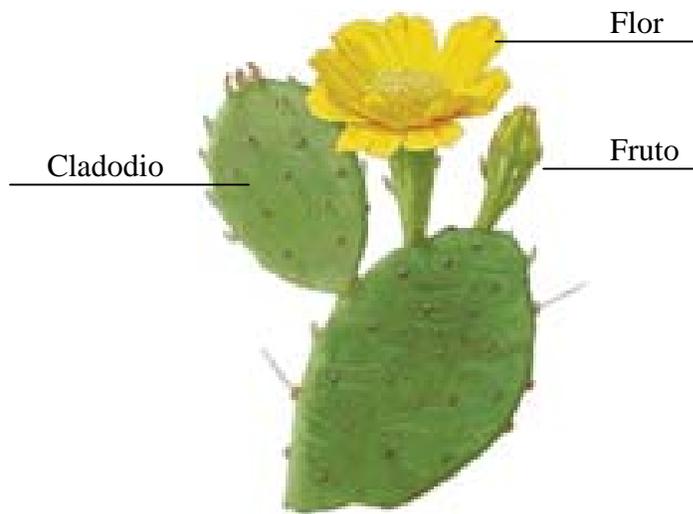


Figura 1. Morfología del nopal

El nopal presenta características morfológicas y fisiológicas adaptadas a la escasa disponibilidad de agua, a las variaciones extremas de la temperatura y en general, a las condiciones de las zonas áridas y semiáridas. Entre las adaptaciones que le permiten almacenar y conservar el agua en sus tejidos tenemos:

- Suculencia. Se debe a un gran desarrollo de los parénquimas que le permite acumular grandes cantidades de agua en sus células.
- Elaboración de mucílagos y sustancias higroscópicas a partir de ácidos orgánicos.
- La superficie foliar que ha sido transformada en la penca adulta es espina y los cladodios al ser aplanados y discoides, en forma de raqueta, representan los cuerpos más eficientes para evitar la evaporación-transpiración del agua.
- La savia viscosa cierra rápidamente las heridas de la planta.

- Metabolismo ácido crasuláceo (MAC), que es el proceso fotosintético en el cual los estomas están cerrados durante el día y abiertos durante la noche, evitando la pérdida de agua por transpiración (INE, 2004).

Clima

Las poblaciones silvestres de nopal se localizan prácticamente en la mayoría de las condiciones ecológicas de nuestro país, con variaciones de temperatura y precipitación pluvial. Las condiciones climáticas en las que prospera el nopal verdura en el país son las siguientes:

El rango óptimo de temperatura está entre 16 °C y 28 °C, soportando una temperatura máxima de 35 °C. Fuera de este rango la brotación se ve afectada. Las bajas temperaturas afectan al cultivo, pudiendo causar su muerte. Su tolerancia a temperaturas mínimas está en el orden de 10 a 0 °C.

En lo que se refiere al nopal silvestre, del cual se aprovechan temporalmente los brotes tiernos para verdura, se adapta a un rango más amplio de precipitación; prospera con precipitaciones medias anuales de 150 mm hasta 800 mm, bien distribuidos durante el año.

En cambio, el nopal verdura cultivado, requiere precipitaciones regulares o riego, para una producción continua. Un factor muy importante que afecta al nopal es la humedad relativa; conforme esta aumenta, la planta se encuentra en condiciones menos propicias para su desarrollo y fructificación, además de estar más propensa al ataque de plagas y enfermedades. Cuando la humedad relativa es demasiado baja influye desfavorablemente al deshidratar el tejido de la planta (INE, 2004).

4.1.2 Usos tradicionales

Desde los primeros asentamientos prehispánicos en el territorio mexicano, el nopal ha estado presente empleándose de diversas formas. Se ha utilizado como alimento y en la preparación de pegamentos. En el México antiguo, el jugo de las pencas era extraído y untado en las ruedas de los carros para impedir que se quemaran por el uso excesivo. Durante los siglos XVII y XVIII, cuando los franciscanos establecieron las misiones en Baja California y zonas adyacentes, iniciaron el cultivo de nopales que entonces eran cultivados en el centro de México. Encontraron que estas cactáceas les eran útiles por sus frutos y por ser fuente importante de un material mucilaginoso que servía de ligamento a los adobes en la construcción de las misiones (INE, 2004).

El nopal configura una de las imágenes que caracteriza a la cultura mexicana, del cual se extraen un conjunto numeroso de productos con una amplia gama de aplicaciones. La tuna y el nopal son los principales productos alimenticios del nopal, el primero como fruta y el segundo como verdura, consumido en la rica cultura culinaria mexicana. El nopal se consume en fresco en ensaladas y platillos diversos y envasado en salmuera, vinagre o como mermelada. Pero la importancia económica del nopal no se limita a estos productos, el uso del nopal como forraje es otro destino conocido con una amplia distribución en el país (Flores et al., 1995).

4.1.3 Aporte Nutricional del Nopal

El nopal, como alimento, tiene una gran aceptación por su costo y por otras propiedades como su fácil digestibilidad por el organismo humano (INE, 2004).

Si bien es cierto que el nopal no es alimento completo, forma parte del menú cotidiano de muchas familias de escasos recursos, sobre todo en las zonas áridas de México. El nopal proporciona ciertos elementos nutritivos como la fibra y el calcio entre otros.

Nopal, Valor Nutricional Porción de 100g de peso neto	
Proporción comestible (%)	78.00
Energía (kcal)	27.00
Proteínas (g)	0.17
Grasas (g)	0.30
Carbohidratos (g)	5.60
Calcio (mg)	93.00
Hierro (mg)	1.60
Tiamina (mg)	0.03
Riboflavina (mg)	0.06
Niacina (mg)	0.03
Ácido ascórbico (mg)	8.00

Tabla 1. Información nutrimental del nopal fresco

En la composición química del nopal, encontramos un alto contenido de agua (90 – 92.5%) y micronutrientes como el calcio y el potasio además de magnesio, sílice, sodio y pequeñas cantidades de hierro, aluminio, y magnesio, entre algunos otros. El nopal contiene también diferentes glúcidos o carbohidratos en diferentes proporciones y algunos componentes nitrogenados.

Quizá una de las principales limitantes para la expansión del mercado externo del nopal verdura es su carácter de “producto de consumo étnico”. Remontar este calificativo implicará un enorme esfuerzo publicitario que promueva el consumo no étnico, desplazando en parte el consumo de productos frutícolas y hortícolas tradicionales. Las expectativas son buenas, puesto que los consumidores de los países desarrollados tienden a buscar nuevas opciones, nuevas presentaciones y sabores, además de la búsqueda incesante por productos más sanos y nutritivos (Flores et al., 1995).

4.1.4 Zonas de producción del nopal verdura

Las principales zonas de producción del país se localizan en nueve estados de la República que son: Aguascalientes, Baja California, Distrito Federal, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas.



Figura 2. Principales zonas de producción de nopal en México. Aguascalientes, Baja California, Distrito Federal, Jalisco, Oaxaca, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Zacatecas.

El área de producción más importante es el Distrito Federal, específicamente la región de Milpa Alta, la cual ocupa el 68% de la superficie y el 80% del volumen de la producción nacional, siguiéndole en orden de importancia San Luis Potosí, con el 8% y Oaxaca, con el 4%. Estas tres entidades junto con Michoacán y Jalisco, representan el 98% de la producción total.

**AVANCE DE SIEMBRAS Y COSECHAS
PERENNES 2005**

SITUACION AL 30 DE JUNIO DE 2005

NOPALITOS

TOTAL
(Riego + Temporal)

DELEGACION	SUPERFICIE (HA.)			PRODUCCION (TON.)		RENDIMIENTO (TON/HA)	
	SEMBRADA	SINIESTRADA	COSECHADA	ESTIMADA	OBTENIDA	ESTIMADO	OBTENIDO
AGUASCALIENTES	245	0	0	9,495	0	38.756	
BAJA CALIFORNIA	384	0	42	13,347	727	34.802	17.310
BAJA CALIFORNIA SUR	62	0	0	280	0	4.490	
CAMPECHE							
CHIAPAS							
CHIHUAHUA	36	0	0	38	0	1.059	
COAHUILA							
COLIMA	9	0	7	143	35	16.765	5.385
DISTRITO FEDERAL	4,336	0	4,336	317,999	154,746	73.339	35.689
DURANGO							
GUANAJUATO	177	0	165	3,551	1,687	20.072	10.232
GUERRERO	16	0	3	345	5	22.258	1.767
HIDALGO	42	0	4	3,555	39	84.643	9.625
JALISCO	474	0	453	6,607	6,135	13.939	13.558
MEXICO	647	0	571	118,647	28,216	183.451	49.394
MICHOACÁN	286	1	125	7,541	3,293	26.460	26.344
MORELOS	2,405	0	2,179	197,860	173,900	82.270	79.826
NAYARIT	67	0	43	529	304	7.866	7.070
NUEVO LEON							
OAXACA	32	0	32	960	638	30.000	19.938
PUEBLA	100	0	0	2,210	0	22.100	
QUERETARO	25	0	25	386	160	15.436	6.396
QUINTANA ROO	4	0	4	96	44	24.000	11.000
REGION LAGUNERA	35	0	0	290	0	8.271	
SAN LUIS POTOSÍ	388	0	388	1,162	776	2.995	2.000
SINALOA	4	0	0	15	0	3.750	
SONORA	50	0	23	397	94	7.940	4.087
TABASCO							
TAMAULIPAS	584	0	415	4,372	2,382	7.479	5.739
TLAXCALA	1	0	1	8	4	15.000	7.000
VERACRUZ	16	0	0	64	0	4.000	
YUCATÁN	5	0	0	250	0	50.000	
ZACATECAS	366	0	103	6,636	578	18.119	5.612
TOTAL	10,794	1	8,917	696,780	373,762	64.556	41.915
COMARCA LAG. DGO.	35	0	0	290	0	8.271	
COMARCA LAG. COAH.							

FUENTE: SERVICIO DE INFORMACIÓN Y ESTADÍSTICA AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP), CON INFORMACIÓN DE LAS DELEGACIONES DE LA SAGARPA EN LOS ESTADOS.

Tabla 2. Producción nacional de nopal verdura por entidades federativas (SAGARPA)

Los principales mercados del nopal verdura en el país son: Ciudad de México, Guadalajara, Monterrey, Puebla, San Luis Potosí, Cuernavaca, Morelia, Torreón y Guanajuato. La exportación del nopal verdura es una actividad relativamente reciente, siendo aún muy bajos los volúmenes dedicados a la comercialización internacional que reportan actualmente 40.9 ton anuales, es decir el 0.02 % de la producción nacional (INE, 2004).

4.1.5 Variedades de cultivo

Entre las variedades utilizadas en el cultivo para verdura podemos mencionar la Criolla tipo Italiana, Criolla, Tlaconopal, Copena F1, y como variedades de excelente calidad tenemos: Atlixco, Copena F1 y Milpa Alta.

La aceptación de las variedades de nopal verdura está basada en preferencias regionales, así tenemos que en el norte y el altiplano, el nopal criollo y los provenientes de nopaleras silvestres son los más aceptados, como el nopal tapón (*Opuntia robusta*), el cual es buscado por su sabor; mientras que en el centro el consumo se inclina preferentemente por nopales del tipo Italiano, Copena y Milpa Alta (INE, 2004).

PRINCIPALES VARIEDADES CULTIVADAS DE NOPAL VERDURA		
<i>Variedad</i>	<i>Entidad de Producción</i>	<i>Especie</i>
Milpa Alta	Distrito Federal, Morelos	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Atlixco	Puebla, Edo. de México	
Copena IV	Edo. de México, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Hidalgo	
Copena F1	Edo. de México, Sonora, Baja California	
Moradilla	Edo. de México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Blanco con espinas	Guanajuato	
Polotitlan	Edo de México	
Tamazunchale	San Luis Potosí, Hidalgo	
Tapón*	San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Querétaro	

* Nopal silvestre y plantado como cerco de huertos familiares y paredes agrícolas, objeto de recolección. Fuente: "Mercado Mundial del Nopalito" ACERCA, UAM, CIESTAAM, MÉXICO 1995

Tabla 3. Diferentes variedades de Nopal verdura cultivados en México

4.1.6 Cosecha del nopal

En las principales regiones productoras de nopal verdura (Milpa Alta, D.F. y Tlalnepantla, Mor.) la cosecha se realiza en forma completamente manual o auxiliada con cuchillo. La operación en general resulta muy sencilla: el cosechador, en una de sus manos sostiene y junta los nopales que va cortando con la otra y luego los deposita en un canasto, lo que generalmente ocurre después de haber recorrido una hilera. Para efectuar el corte, el cosechador toma al nopal de su parte inferior y le da un giro de más de 90 hasta desprenderlo de la penca madre. Si esta operación no se realiza con el debido cuidado, los tejidos se pueden desgarrar y quedar porciones de cladodio en la penca madre, lo cual representa un peligro de infección potencial de algunos patógenos.

En la cosecha manual auxiliada con cuchillo también es conveniente proteger las manos con guantes. El cosechador sostiene al nopal con una mano y con la otra realiza el corte con el cuchillo a nivel de la base, logrando así una separación más uniforme y limpia, ya que ni el nopal ni la penca madre se rasgan ni lesionan. En este caso los nopales se van acomodando en canastos. En general es aconsejable que los nopales ya cortados se protejan inmediatamente del sol, colocándolos bajo sombra, con lo que se evita su calentamiento y se aumenta su potencial de vida de anaquel y de comercialización (Flores et al., 1995).

La temporada de cosecha de nopal verdura puede iniciar a partir del mes de marzo y concluir a finales de septiembre cuando la producción es a cielo abierto, o bien puede prolongarse durante todo el año. En cualquier caso, generalmente el corte se realiza en la mañana, muy temprano, para dar oportunidad que ese mismo día el producto se pueda vender en los mercados locales y de la ciudad de México. En cuanto a la hora del corte, se debe tener presente que el

nopal presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas, por lo que su acidez varía durante el día y la noche.

Rodríguez y Cantwell (1988) encontraron que la acidez del nopal (*O. ficus-indica*) fluctúa desde 0.52 % a las 9 hr hasta 0.1 % a las 15 hr.

El índice de cosecha más empleado para el nopal verdura es el tamaño de la penca o cladodio, el cual se corta por lo regular cuando presenta una longitud de 18 a 23 cm; si la venta es por peso, es más conveniente el mayor tamaño, pero se debe tener en cuenta que entre más tiempo se dejen crecer, los nopales se tornan fibrosos y correosos, debido a la producción de lignina en los tejidos, causando que el producto pierda uno de sus principales atributos de calidad, que es su condición de frescura (Flores et al., 1995).

Luego de haber sido cortados y depositados en canastos, los nopales se pueden llevar directamente al mercado local sin ningún tipo de acondicionamiento e incluso con todo y espinas. Cuando los mercados están distantes, entonces los canastos se llevan a un área sombreada, donde se realiza el acondicionamiento y empaqueo del producto para su protección y para facilitar su manejo, transporte y comercialización. La forma en que se transporta el nopal para su venta depende del lugar donde se produce y a donde se va a vender, existiendo cinco formas básicas:

- a) A granel en camioneta. Nopales con espinas acomodados en una camioneta que los transporta a distancias cortas para su venta en mercados locales.
- b) Canastos. También son usados cuando el nopal verdura se vende (con espinas) en los mercados locales. La capacidad de los canastos es de aproximadamente 200 nopales de 18 a 23 centímetros de longitud.

c) Costales. Son usados cuando el producto se vende en la central de abastos de la ciudad de México y otros mercados urbanos. El nopal verdura debe ir sin espinas, en una cantidad que fluctúa entre 500 y 550 piezas.

d) Cajas de cartón. Son usadas para el transporte y la comercialización de los nopales producidos en California, E.U.A., o bien para transportar el nopal que se produce en el norte de México (cerca de la frontera) y que se exporta a E.U.A. También se utilizan para la comercialización con tiendas de autoservicio. Son empaques de 10 a 15 kg de capacidad.

e) Rejas. Son usadas en el nopal que se vende en Milpa Alta para los mercados de ciudades lejanas: Torreón, Coahuila, Monterrey, Nuevo León, Morelia, Michoacán, Guadalajara, Jalisco. En la mayoría de las zonas productoras se utiliza este tipo de envase.

f) Paca cilíndrica. Forma o estructura que surgió a mediados de los años sesentas, en sustitución de la paca cuadrada que se utilizaba anteriormente. Se utiliza cuando el producto se vende en la central de abastos del D.F. o de alguna otra ciudad del centro del país. Este empaque consiste en una estructura cilíndrica vertical cuya altura puede ser de 1.6 a 1.75 m, con un diámetro de 0.7 a 0.8 m; en esta paca se pueden manejar de 2,500 a 3,000 nopales de 18 a 23 cm de longitud.

En virtud de que los períodos de comercialización son relativamente cortos (de uno a tres días) la paca cilíndrica ha resultado muy práctica. Sin embargo, si los períodos de comercialización tuvieran que ser más prolongados, en el centro de estas pacas se generaría una cantidad considerable de calor por la respiración de los nopales, lo cual se traduciría en un rápido decremento del peso y de la calidad (marchitez y mal aspecto) del producto; además se tendrían otros efectos como la caída de hojas y la proliferación de pudriciones (Flores et al., 1995).

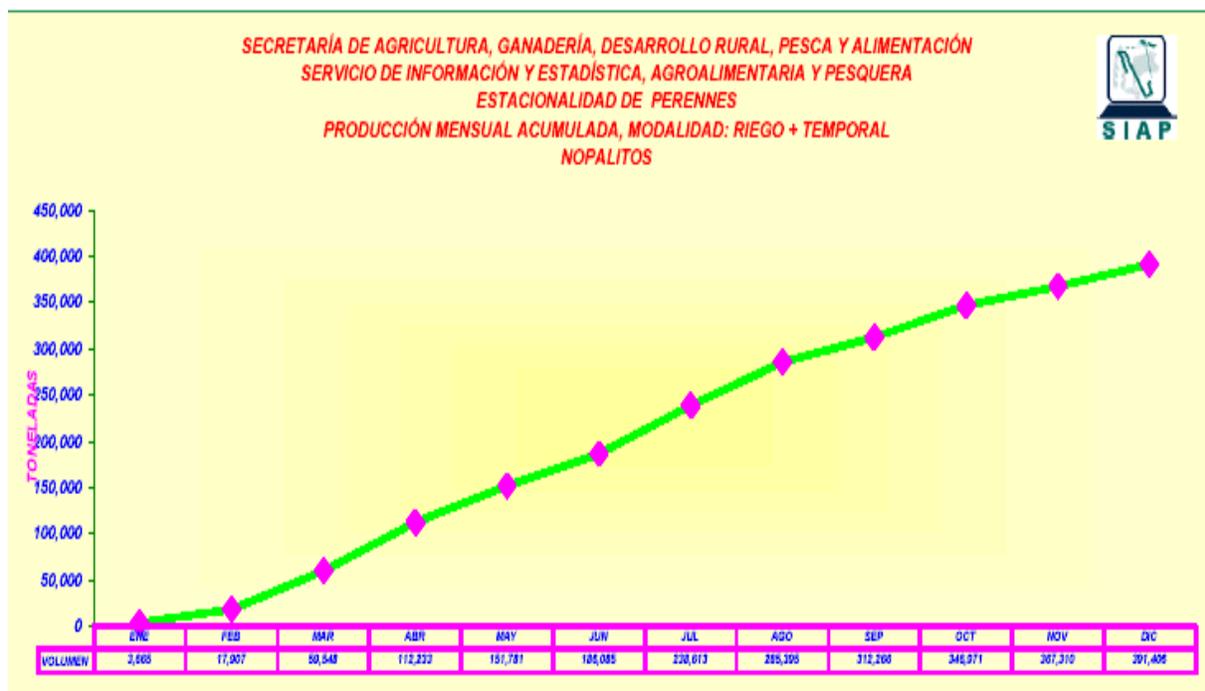
Una de las limitantes de la exportación del nopal, es la necesidad de exportar el nopal con espinas, debido a que el nopal verdura limpio se oxida con los cortes gracias a la acción enzimática en presencia de oxígeno (Zamora, 2004).

No obstante, la exportación de nopal verdura es considerada como una actividad promisoriosa, especialmente si se piensa en la posibilidad de su envasado o la inhibición de su acción enzimática (como la inhibición del pardeamiento enzimático).

4.1.7 Mercado internacional del nopal

A finales de los años setenta México inicia las exportaciones de nopal verdura a los E.U.A. orientadas al nicho de mercado de la población mexicana residente en E.U.A. Las exportaciones se realizaban en invierno debido a que la demanda había aumentado por la creciente población de origen mexicano, con ingresos más altos y porque en los meses de invierno cesa la producción de nopal verdura de California y Texas. Este mercado ha seguido creciendo. A principios de los ochenta comenzó la producción en Baja California y en la Huasteca Potosina, para abastecer el mercado californiano y texano respectivamente.

En los ochenta también comienza la exportación de nopal verdura procesado en salmuera o en escabeche, expandiendo las exportaciones a Canadá y a países europeos. Actualmente se exportan alrededor de 3,500 t a E.U.A. y Canadá y unas 500 t a Europa. Teniendo una producción que aumenta después del mes de marzo ya sea en la modalidad de riego o de temporal (ver gráfica 1).



Gráfica 1. Producción Mensual de nopal verdura en México (SAGARPA)

El único país que se ha incorporado a las exportaciones de nopal verdura recientemente ha sido Chile en los años noventa, con pequeñas cantidades exportadas en fresco a los E.U.A. El mercado internacional del nopal verdura es de poca significación, en fresco abarca unos 2.5 millones de dólares y procesado 7.5 millones de dólares.

Puesto que el consumo de nopal verdura es casi exclusivo a la población de origen mexicano, el mercado de E.U.A. presenta un gran potencial. Actualmente sólo se cubre menos del 6 % de este mercado en E.U.A. (Flores, 1995).

4.2 Pardeamiento enzimático

4.2.1 Definición. El pardeamiento enzimático es el fenómeno oxidativo normal que ocurre en el transcurso de las manipulaciones que se realizan después de la recolección, durante la conservación y por las transformaciones tecnológicas que sufren las frutas y hortalizas de baja

acidez como la papa, manzana, plátano, durazno, nopal, tabaco, té, café, chícharo, aguacate, entre muchos otros (ver figura 3).

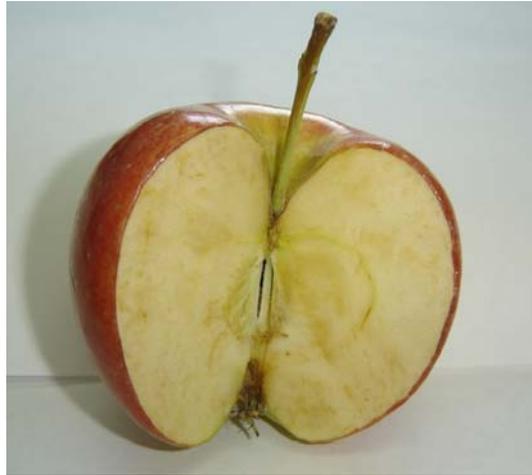


Figura 3. Pardeamiento enzimático en manzana, nopal y plátano

Este fenómeno se presenta cuando los tejidos han sufrido daños físicos y han sido expuestos al oxígeno, pues en las células intactas del fruto o vegetal hay un microambiente anaerobio y una separación de la enzima y el sustrato; de esta forma, al encontrarse en compartimientos celulares separados se inhibe el mecanismo de reacción. La aparición de pigmentos pardos ocasiona modificaciones organolépticas llevando a los vegetales y a sus productos a una depreciación importante (Billot, 2002).

En la mayoría de los casos de pardeamiento se presenta una característica común: la puesta en contacto de los compuestos fenólicos (de localización principalmente vacuolar) con las enzimas de oxidación (citosólicas o de membrana) y para que se inicie el pardeamiento es indispensable que se produzca una modificación de la separación subcelular; la cual se puede alcanzar con múltiples factores de alteración de los tejidos como los traumatismos mecánicos, choques térmicos o alteraciones fisiológicas (Fennema, 1993).

4.2.2 Tipos de Pardeamiento

Aunque algunos pardeamientos pueden tener un origen no enzimático (reacción de Maillard, por ejemplo), la mayoría de ellos, particularmente los que aparecen de forma muy rápida son debidos a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos por acción de las polifenoloxidasas (PPO) o de las peroxidasas (PO). También cabe la posibilidad de que el pardeamiento se origine por la combinación de diferentes fenómenos, tal es el caso del desarrollo del color pardo en los purés y en los zumos ya que en primer lugar se debe a la oxidación de los compuestos fenólicos por las PPO en los tratamientos tecnológicos y de forma secundaria, si hay calentamiento, se debe a la formación de productos de la reacción de Maillard (Walker et al, 1995).

Más allá de presentarse como un problema para la industria alimentaria, el pardeamiento enzimático no es indeseable en todos los casos. Como en la producción del té, del café o la cocoa, donde estas reacciones son esenciales en los procesos. Probablemente el ejemplo más estudiado del beneficio del pardeamiento es la producción del té negro, donde la PPO de las hojas del té llevan un rol importante en la etapa de fermentación. Aquí, los sustratos naturales catequina, epicatequina y sus productos de oxidación, *o*-quinonas, son precursores de flavinas más complejas las cuales contribuyen al color y al sabor del té.

Durante la producción de sidra y vino blanco, la acción de las PPO's en los compuestos fenólicos y en los taninos llevan a una condensación y una polimerización; estas reacciones tienen un rol importante en los procesos de clarificación y de eliminación de la astringencia.

4.2.3 Enzimas causantes del pardeamiento enzimático

Las enzimas que intervienen en la oxidación de los compuestos fenólicos son las polifenoloxidasas (PPO) y las peroxidasas (PO). El papel esencial lo desempeñan las PPO que se presentan en gran cantidad de frutas como la manzana y la uva, y en hortalizas como la papa. Aunque la peroxidasa no es la principal enzima causante del pardeamiento de los vegetales, cumple una función similar en algunos vegetales que no contienen polifenoloxidasas o se encuentran en concentraciones muy bajas.

4.2.3.1 La polifenoloxidasa (PPO)

La polifenoloxidasa (cuyo nombre bioquímico es *o*-difenoil-oxígeno-oxidoreductasa) es conocida también como fenolasa, *o*-difenoiloxidasa, tirosinasa o catecolasa, debido a que no todas las PPO actúan sobre el mismo sustrato.

Los sustratos más comunes son compuestos insaturados, principalmente los que tienen estructuras de monofenoles o de *o*-difenoles, entre los que destaca la tirosina en la papa (por esta razón a la polifenoloxidasas de este tubérculo se le llame tirosinasa), los flavonoides y los taninos en el café y el cacao, el ácido clorogénico en la manzana, así como las antocianinas, el ácido caféico, la 3,4-hidroxifenolalanina (L-DOPA), la dopamina, el p-cresol, el catecol entre otros (Badui, 1996).

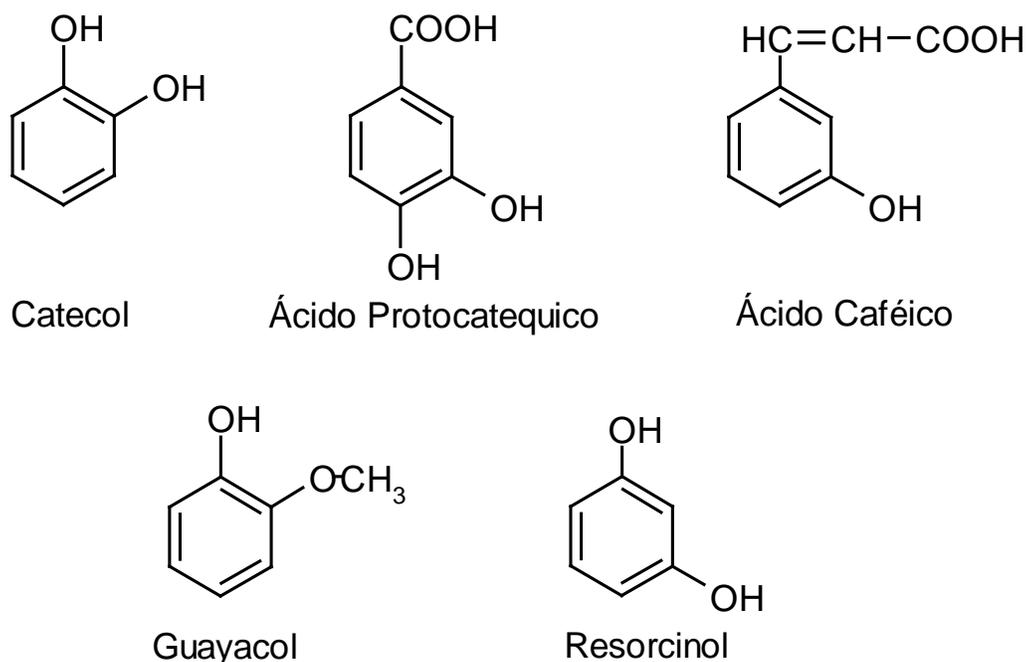


Figura 4. Fenoles que son sustratos de la polifenoloxidasas (tomado de Badui, 1996, pág. 311)

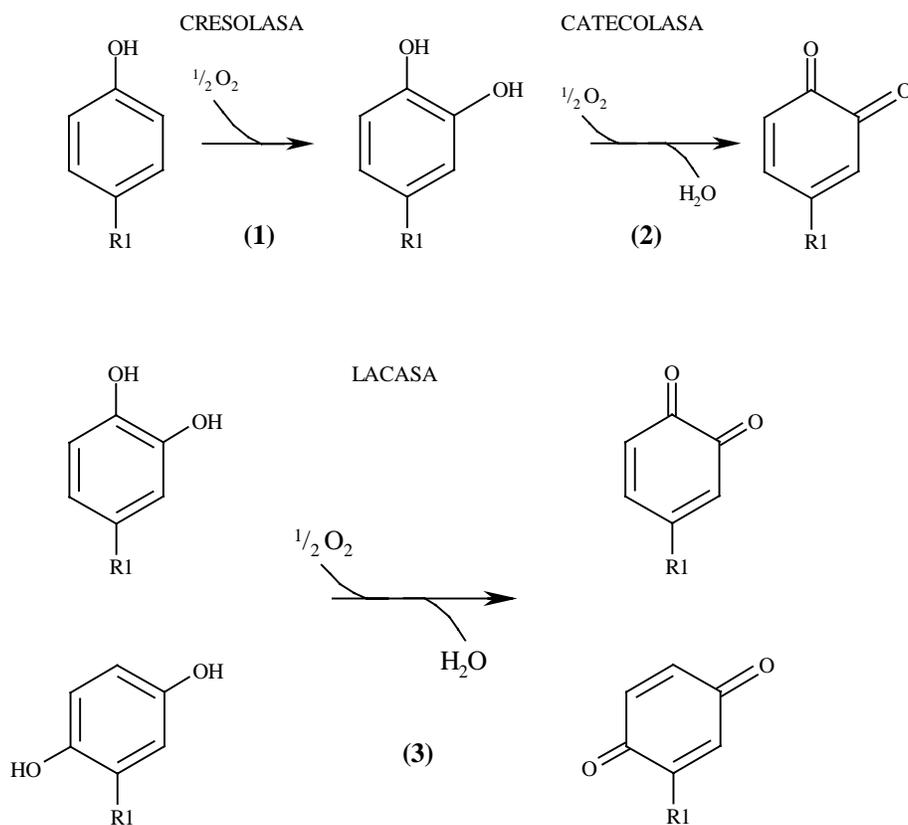
Las polifenoloxidasas requieren de iones cobre como cofactor, ya sea en estado monovalente, como sucede con las del champiñón, o divalente, como en las de la papa; su pH óptimo de actividad es de 5 a 7 y tienen estructuras oligoméricas en las que cada monómero contiene su cofactor correspondiente (Badui, 1996).

Dos tipos de polifenoloxidasas actúan sobre los fenoles en presencia de oxígeno: Las catecoloxidasas que catalizan dos reacciones distintas a) la hidroxilación de los monofenoles en

o-difenoles y b) la deshidrogenación de los *o*-difenoles en *o*-quinonas. Estas dos reacciones consumen oxígeno y se denominan por los términos de la actividad creolasa (o monofenolasa) y de la actividad catecolasa (u *o*-difenolasa), respectivamente (figura 5) (Billot, 2002).

Las lacasas (polifenoloxidasas) oxidan los *o*-difenoles pero también los *p*-difenoles, transformándolos en las correspondientes quinonas, *o*-quinonas o *p*-quinonas (Billot, 2002).

Figura 5. Reacciones catalizadas por las polifenoloxidasas y lacasas



- 1: Hidroxilación de un monofenol en *o*-difenol.
- 2: Deshidrogenación de un *o*-difenol en *o*-quinona.
- 3: Deshidrogenación de un *o*- o *p*-difenol en *o*- o *p*-quinona.

(tomada de Billot, 2002, pág. 236)

Los compuestos fenólicos que presentan un grupo orto-difenólico se oxidan fácilmente por las polifenoloxidasas. La formación de productos coloridos que caracterizan el pardeamiento

se realiza en dos etapas: una etapa enzimática que conduce a la formación de orto-quinonas y una etapa no enzimática que termina con la polimerización y condensación de las quinonas en complejos de color pardo; dependiendo de la intensidad de la polimerización, se tiene que las melaninas varían su color desde un ligero amarillo, café oscuro hasta el negro (Baurin et al., 2002).

4.2.3.2 La peroxidasa (PO)

Las peroxidasas constituyen un grupo de enzimas presentes en los vegetales y en los leucocitos. También existe una peroxidasa en la leche, una de las mejores fuentes conocidas de esta enzima. La peroxidasa se caracteriza por su capacidad para oxidar diferentes donadores de hidrógeno. Esta enzima está implicada en diversas funciones bioquímicas y fisiológicas, en particular en la reticulación de la pared celular por los ácidos fenólicos y en la disposición de las ligninas. Las reacciones catalizadas por las peroxidasas generan compuestos que modifican el sabor de los productos vegetales y favorecen el pardeamiento (Ponce, 2003).

Las peroxidasas pueden clasificarse de la siguiente manera:

I. Peroxidasas con hierro

- a. Peroxidasas de ferriprotoporfirinas. Este grupo incluye peroxidasas de plantas superiores (rábano, nabo, higo), de animales (triptofano pirrolasa, peroxidasa de yodo de la tiroide) y de microorganismos (peroxidasa del citocromo C de levaduras). Todas estas peroxidasas contienen ferriprotoporfirin III como grupo prostético el cual puede extraerse de la fracción proteínica con acetona acidificada. Las enzimas son de color café cuando están purificadas.

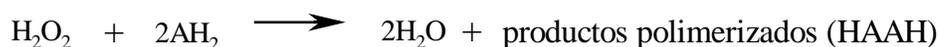
b. Verdoperoxidasas. Las verdoperoxidasas se encuentran en los mielocitos (mieloperoxidasas), en la leche (lactoperoxidasa) y en varios tejidos. El grupo prostético de estas enzimas es una porfirina de hierro pero no una ferriprotoporfirina III. Cuando están purificadas la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa son verdes porque su absorbancia máxima es en la región de 570 a 690 nm. El grupo prostético no se extrae de la proteína con acetona acidificada ni con sulfato de plata

II. Flavoprotein peroxidasas

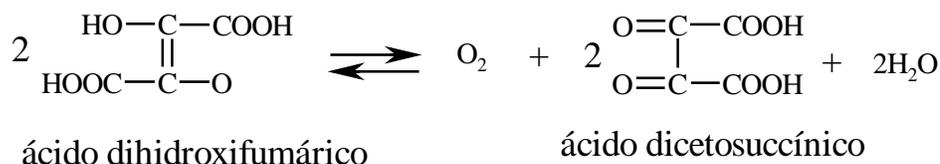
Las flavoprotein peroxidasas han sido purificadas de varios estreptococos incluyendo *Streptococcus faecalis* y de varios tejidos animales. El grupo prostético de estas peroxidasas es FAD (Whitaker, 1972).

Las peroxidasas están asociadas a cuatro tipos de reacciones: peroxidación, oxidación, catalítica e hidroxilación.

1. Peroxidación



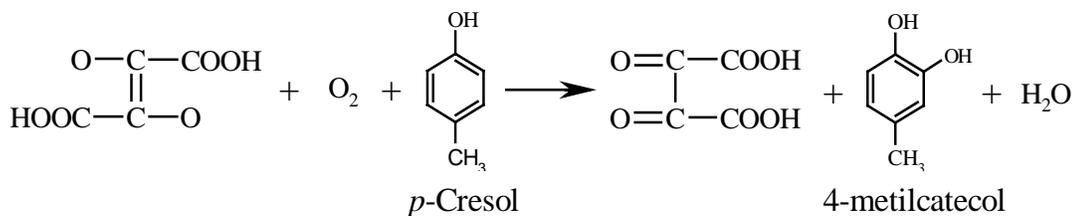
2. Oxidación



3. Catalítico



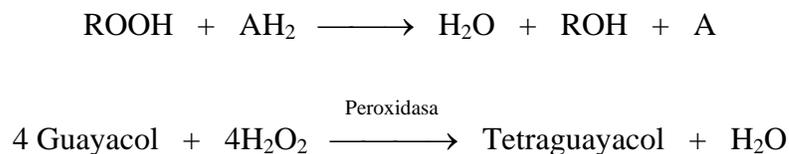
4. Hidroxilación



(tomado de Whitaker, 1972, pág. 595)

La reacción de peroxidación ocurre cuando el *p*-cresol, el guayacol, el resorcinol o la anilina, entre otros, es usado como sustrato. La reacción oxidativa ocurre cuando el sustrato es ácido dihidroxifumárico, ácido ascórbico, hidroquinonas, etc., y requiere de oxígeno molecular. En ausencia de un donador de hidrógeno, la peroxidasa puede convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno mediante una reacción catalítica. Esta reacción es por lo menos mil veces más lenta que las reacciones de peroxidación y oxidación. En presencia de ciertos donadores de hidrógeno, particularmente el ácido dihidroxifumárico y oxígeno molecular, la peroxidasa puede hidroxilar una variedad de compuestos aromáticos, incluyendo la tirosina, la fenilalanina, el *p*-cresol, y los ácidos benzoicos y salicílicos (Whitaker, 1972).

Las peroxidasas vegetales suelen contener un grupo prostético hemo (ferriprotoporfirina IX). De forma general las peroxidasas catalizan la siguiente reacción:



El proceso catalítico de la peroxidasa produce la oxidación transitoria del ion férrico (Fe^{3+}) a estados de valencia más alta (Fe^{5+} o Fe^{4+}). En la reacción anterior, el peróxido se ve reducido a la vez que resulta oxidado un donador de electrones (AH_2). Pueden operar como tal el ascorbato, los fenoles, las aminas y otros compuestos orgánicos (Whitaker, 1972).

Por su alta resistencia a la inactivación por calor, la peroxidasa se utiliza en algunos alimentos como indicador de la eficacia de tratamientos térmicos subesterilizantes como es el caso de la pasteurización de la leche (Sherman, 1995).

La peroxidasa parece ser importante desde el punto de vista del valor nutritivo, sabor y olor de los alimentos. Por ejemplo, la actividad peroxidasa puede producir la destrucción oxidativa de la vitamina C. También la peroxidasa cataliza la decoloración de los carotenoides en ausencia de ácidos grasos insaturados y la de las antocianinas. El grupo hemo, como el de la peroxidasa, cataliza la descomposición de los hidroperóxidos con formación de radicales libres, los cuales pueden provocar la destrucción de una amplia variedad de componentes de los alimentos (Baurin et al., 2002).

Alimento	Enzima presente
Aguacate	Polifenoloxidasa
Pera	Polifenoloxidasa
Manzana	Polifenoloxidasa
Uva	Polifenoloxidasa
Champiñón	Polifenoloxidasa
Papa	Polifenoloxidasa
Litchi	Polifenoloxidasa y peroxidasa
Rábano	Peroxidasa
Jicama	Peroxidasa
Fresa	Peroxidasa
Col	Peroxidasa

Tabla 4. Polifenoloxidasas y peroxidasas en los alimentos

4.2.4 Características secundarias del pardeamiento enzimático

Se han mencionado las características principales de las enzimas causantes del pardeamiento enzimático pero también es necesario tomar en cuenta aspectos que no necesariamente tienen relación directa con el pardeamiento del producto pero sí con la actividad enzimática.

Además de la descompartimentalización subcelular de origen mecánico o fisiológico, el desarrollo del pardeamiento en una fruta u hortaliza y su intensidad dependen de varios parámetros de los cuales los más importantes son: a) la especie de la que provienen, b) el grado de madurez de la fruta o vegetal, c) la temperatura a la que se encuentra, d) el pH del medio, e) la humedad, f) la actividad de las enzimas de oxidación, g) el contenido de sustratos fenólicos oxidables, h) la disponibilidad de oxígeno, i) la presencia de cofactores y j) de inhibidores naturales de pardeamiento, como el ácido ascórbico.

Además pueden interferir factores secundarios tales como la integridad de los compartimientos celulares, la presencia de enzimas protectoras que se oponen al pardeamiento (catalasa y ascorbato peroxidasa) y el estado fisiológico del vegetal, particularmente el de los tejidos (Coultate, 1998).

4.2.5 Inhibidores del pardeamiento enzimático

Los métodos de conservación que se aplican a los productos mínimamente procesados, ya sea en su forma aislada o combinada son los siguientes: escaldado térmico, refrigeración, congelación, radiación ionizante, metilación de los sustratos de las polifenoloxidasas, y conservación química (aditivos). Estos métodos se utilizan para evitar la acción de las enzimas del producto o por descomposición microbiana. Dentro de las enzimas del producto se encuentran las polifenoloxidasas y las peroxidasa, causantes del pardeamiento enzimático.

Para prevenir el pardeamiento enzimático en diferentes productos se utilizan la acidificación, la alcalinización del medio, los inhibidores y las temperaturas elevadas. En general, para obtener una inactivación total o parcial de las enzimas es suficiente una corta exposición a temperaturas de 70 a 90 °C.

Los inhibidores de la PPO pertenecen a dos grupos: los compuestos que reaccionan con el cobre de la enzima y los que afectan al sitio activo para el sustrato fenólico. Entre los primeros, se encuentran los agentes quelantes de los iones metálicos tales como los nitruros, los cianuros, el monóxido de carbono y el dietilditiocarbamato que son específicos para el cobre, pero que la mayoría de éstos son tóxicos y no pueden utilizarse en la industria agroalimentaria (Billot, 2002).

En el segundo grupo de inhibidores, se encuentran los ácidos carboxílicos de las series benzoicas y cinámicas debido a que su estructura se asemeja a la de los sustratos fenólicos de las

PPO, los cuales impiden la unión con el sustrato o ligan el sitio activo incapacitándola para catalizar la reacción (Billot, 2002).

En general, la metodología para inhibir la reacción catalizada por las enzimas del pardeamiento es eliminar uno o más de los elementos esenciales: oxígeno, enzima, sustrato o cofactores como los metales. El oxígeno puede ser excluido del sitio de reacción por inmersión en agua, jarabe, salmuera o empaque al vacío o atmósfera modificada. Sin embargo, cuando el empaque es abierto el oxígeno se introduce y puede ocurrir el pardeamiento rápidamente (Lambrecht, 1995).

La PPO puede ser inhibida por tratamientos térmicos o adición de agentes que neutralicen el pardeamiento enzimático. Los tratamientos térmicos pueden desnaturalizar el complejo enzimático. El escaldado con vapor es usado efectivamente para inhibir la PPO en alimentos congelados o enlatados. Sin embargo, el escaldado puede afectar el sabor y la textura del producto fresco (Lambrecht, 1995).

Los agentes acidulantes, quelantes, reductores y otros compuestos químicos pueden inhibir o controlar el pardeamiento enzimático. Los acidulantes como los ácidos cítrico, málico y fosfórico disminuyen el pH del sistema a 3, al cual la PPO se inactiva. Sin embargo, no siempre es posible disminuir el pH de alimentos frescos debido al significativo sabor ácido que prevalece.

Los agentes quelantes como el EDTA, los fosfatos y el ácido cítrico pueden secuestrar el cobre del sitio activo de la enzima PPO o reducen el nivel de cobre disponible para incorporar a la enzima. Los agentes quelantes disminuyen la reacción enzimática pero no la inhiben completamente.

Adicionalmente, los sustratos fenólicos pueden ser removidos de la reacción formando complejos con ciertas sustancias como ciclodextrinas o por modificación química. Sin embargo,

el costo y la regulación impiden la comercialización de estos dos procedimientos. La adición de agentes reductores, sulfitos y ascorbatos, es un método efectivo para controlar el pardeamiento enzimático (Walker, 1995). Los sulfitos son poderosos inhibidores del pardeamiento enzimático, desnaturalizan parcialmente la enzima por la formación de un complejo con la proteína. Los sulfitos limitan eficazmente el pardeamiento además de poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Lambrecht, 1995).

Otra clase de reactivos que se utiliza para inhibir el pardeamiento enzimático son aquellos que reaccionan con las quinonas: ácido ascórbico, compuestos tiol y bisulfito, principalmente. Los efectos de estos compuestos son:

- por una parte, reducir las *o*-quinonas transformándolas en *o*-difenoles: es el caso del ácido ascórbico, un antioxidante natural.
- por otra parte, formar productos de adición incoloros con las *o*-quinonas: es el caso de los compuestos tiol (cisteína, glutatión, etc.) y de los sulfitos.

Los inhibidores de las polifenoloxidasas se pueden clasificar en cinco grupos. (tabla 5)

Grupo	Ejemplos
I. Agentes reductores	Ácido ascórbico, SO ₂ , metabisulfito de sodio, tioglicolato, mercaptoetanol, 2-mercaptobenzotiazol.
II. Agentes quelantes del cobre	Dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), monóxido de carbono.
III. Acopladores de quinonas	Cisteina, glutatión, penicilamina, SO ₂ , metabisulfito de sodio.
IV. Análogos del sustrato	Ácido cinámico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico.
V. Otros inhibidores	4-hexil-resorcinol, ácido kojico, ácido sórbico, PVP

Tabla 5. Clasificación de inhibidores (Walker, et al, 1995)

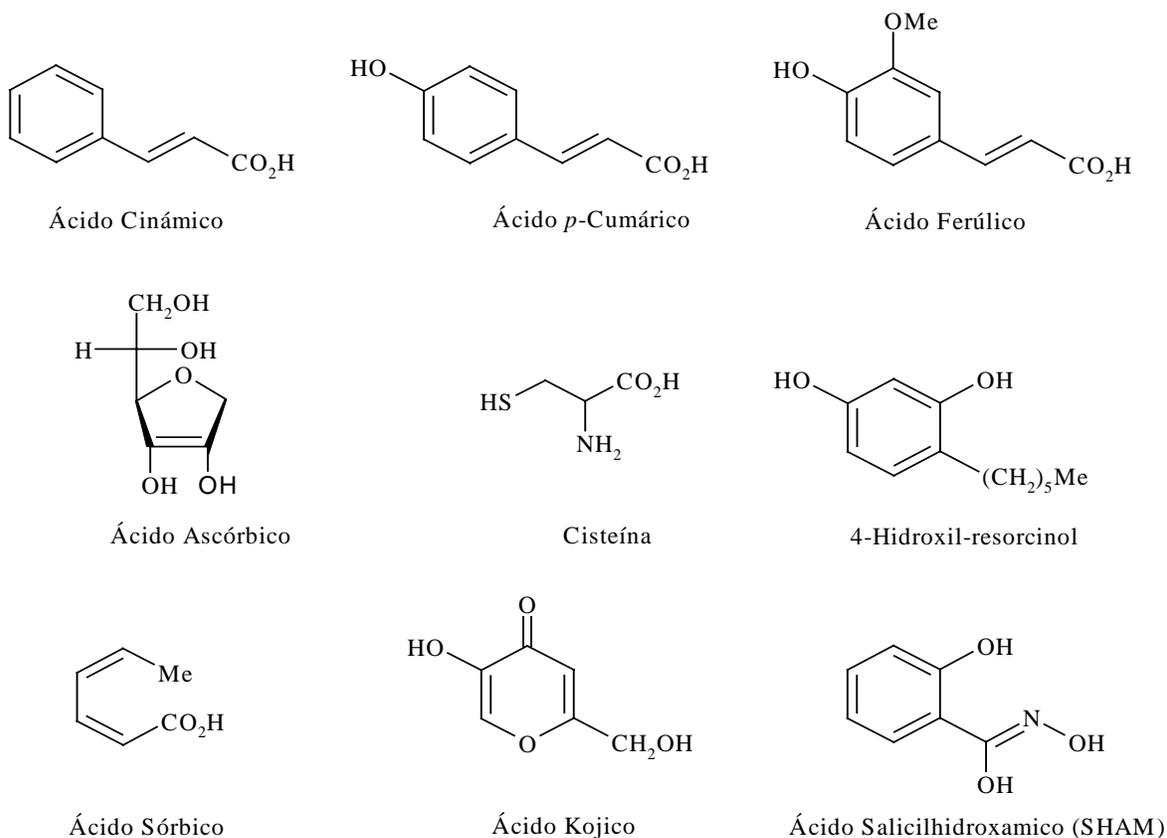


Figura 6. Estructuras de diferentes inhibidores del pardeamiento enzimático

(tomado de Walter, 1995, pág. 837)

Los inhibidores de la PO son, principalmente, los ya mencionados para la PPO a excepción del cobre ya que la PO tiene hierro en su sitio activo y no cobre.

Es importante destacar que el uso de conservadores no mejora la calidad de un producto que esté alterado o contaminado, de ahí que se sugiera la previa desinfección de las materias primas, además de que para lograr una mejor absorción de las sustancias químicas (conservadores) hacia el tejido se recomienda reducir el tamaño del producto para aumentar la superficie de contacto (Zamora, 2004).

4.3 Nopal desespinado

4.3.1 Características generales. Los alimentos mínimamente procesados son los que han sido cosechados, lavados, cortados, posiblemente escaldados y almacenados a bajas temperaturas con el fin de mantener la frescura, calidad sensorial y nutricional hasta su consumo mediante su distribución en condiciones controladas. En el caso del nopal verdura se dice que se encuentra mínimamente procesado cuando se ha cosechado, lavado y desespinado (Zamora, 2004).

4.3.2 Procesamiento y Transformación Industrial del nopal verdura

El aprovechamiento potencial del nopal en el ámbito industrial abarca diversos productos:

4.3.2.1 Productos de la industria alimentaria tradicional y tecnificada. El nopal verdura se exporta fresco o procesado en diferentes formas como se describe a continuación:

4.3.2.1.1 Nopal verdura fresco con espinas. Los productores del norte de México (Baja California, Zacatecas, San Luis Potosí y Tamaulipas) lo exportan casi todo el año. En invierno, al disminuir la producción en California y Texas a causa de las bajas temperaturas, se solicita nopal verdura a la Central de Abastos del D.F., realizándose los embarques por carretera o esporádicamente por avión en empaques de cartón.

4.3.2.1.2 Nopal verdura desespinado. El nopal verdura se desespina o se desespina y pica en trozos pequeños en las ciudades fronterizas (Tijuana, B.C. y Reynosa, Tamps.) con mano de obra barata, se coloca en bolsas de polietileno y se transporta en camiones refrigerados a las ciudades de Los Angeles en California, San Antonio, Houston y Dallas en Texas, para su distribución a supermercados, en donde se expende sobre mesas con frío.

Los principales productos que se obtienen son los nopales en salmuera y en escabeche, salsa de nopal, mermelada de nopal y nopales confitados. En volumen, los productos más importantes son los nopales en salmuera y en escabeche.

Para cualquiera de estos productos, el procesamiento inicia con la recepción y acomodo de la materia prima, que de preferencia deben ser nopales de la mejor calidad y ya desespinaados por los productores.

El acondicionamiento posterior consiste básicamente en escaldar y lavar el producto, con el propósito de inactivar enzimas, destruir microorganismos, ablandar el producto y eliminar parcialmente el mucílago. Los principales factores a considerar en este proceso son el tiempo y la temperatura de escaldado, así como la adición de ciertos compuestos que ayudan a tener mejores resultados. Estos factores se deben ajustar al tipo de materia prima (especie y variedad) de que se disponga. Luego, se realiza un lavado con agua fría, lo que implica un choque térmico, elimina pectinas y mucílago adherido, además fija el color verde característico del producto.

El nopal resultante de esta fase de acondicionamiento es la materia prima que se puede destinar a cualquiera de los diferentes procesos: salmuera, escabeche, mermelada o confitado.

4.3.2.1.3 Nopal verdura procesado en salmuera o en escabeche. La exportación de nopal verdura procesado la realizan gran número de empresas, para lo cual deben cumplir las normas sanitarias, arancelarias y comerciales de México y E.U.A. (o de los otros países a donde esporádicamente se exporta). La forma más común de procesar es en salmuera (agua con sal), agregando al nopal verdura, cilantro, cebolla y chile. En escabeche, el nopal verdura se prepara con vinagre, puede ir sólo o comúnmente acompañado de especias, ajo, zanahoria, chile y cebolla. La mayoría de las empresas envasan en vidrio, algunas enlatan y otras más lo manejan en

bolsas de polietileno. Las principales empresas procesadoras de nopal verdura manifiestan que toda su producción la venden y que el mercado potencial es muy significativo para este producto.

Para los nopales en salmuera, el salado se realiza en recipientes con salmuera al 12 %, el nopal verdura permanece de 10 días hasta ocho semanas. Los recipientes deben estar tapados para evitar contaminaciones y decoloración del producto por acción de la luz.

Al finalizar el salado, el producto se lleva a la sala de proceso, donde por medio de lavados se desala, luego se selecciona, se pica y se envasa en frascos o bolsas junto con algunas especias y líquido de cobertura (salmuera al 2 %). Las bolsas se sellan, los frascos se cierran y esterilizan, después se dejan escurrir hasta secarse, para luego etiquetarlos. El producto también se puede comercializar a granel sin desalar.

Los nopales en escabeche se preparan pasando al corte (picado manual o mecánico) el nopal verdura previamente acondicionado: paralelamente se prepara el escabeche que consiste en una mezcla obtenida de vinagre (1.87-2.0 % de ácido acético) con especias, plantas aromáticas y aceite de oliva. Se envasa en frascos que luego se esterilizan a baño maría, se enfrían, se sellan y se etiquetan.

4.3.2.1.4 Mermelada de nopal Se elabora picando, en forma manual o mecánica, el nopal verdura previamente acondicionado y luego se hace la preparación de la mermelada, hasta obtener 65° Brix como mínimo, el producto se envasa en caliente (85 °C). Después del llenado, los envases se tapan y luego se enfrían por inmersión en agua.

4.3.2.1.5 Nopal verdura precocido y congelado. Recientemente se ha comenzado a preparar nopal precocido y congelado, empacado en bolsas de polietileno y los cuales han concurrido a los mercados nacionales y extranjeros.

Las importaciones de nopal verdura de E.U.A. provienen en un 99.9 % de México. Las exportaciones de nopal verdura procesado se realizan en su mayoría en frascos con nopales cortados en salmuera o escabeche, otra forma de prepararlos es en mermelada pero ha tenido poca aceptación.

4.3.2.2 Productos medicinales.

La industrialización del nopal con fines medicinales tiene su origen en la herbolaria, al nopal se le atribuyen propiedades curativas en problemas tales como afecciones renales; se sabe además que ayuda a inducir los partos y es excelente para aliviar dolores y cicatrices causadas por quemaduras.

En años recientes algunos investigadores han estudiado a nivel científico sus efectos en el tratamiento de la diabetes mellitus y en problemas de colesterol. Muchos de estos estudios se han realizado o llevado a cabo en el Seguro Social con diabéticos no insulino-dependientes y con personas sanas, demostrando que el consumo del nopal fresco, asado o cocido, abate en la sangre los niveles de azúcar y de colesterol (Flores et al., 1995).

Los productos de la industria alimentaria del nopal tienen en común la obtención de gran cantidad de residuo al desespinarlo. Este residuo, en algunos casos, se usa como forraje para animales. Sin embargo, la cantidad de residuo obtenido es mayor a la que se utiliza como forraje por lo que representa un problema para los productores quienes tienen que desecharlo.

4.3.3 Problemas que se presentan en los productos del nopal

4.3.3.1 En relación al desespinado:

Las espinas del nopal son probablemente el principal problema, pues dificultan su manejo y aceptación. En México el nopal verdura se mueve en toda la cadena de comercialización con

espinas y es el detallista en el tianguis, el mercado municipal o en el autoservicio donde es ofrecido desespinado al consumidor. El tiempo entre desespinado y poner en refrigeración el nopal verdura debe ser corto para evitar la oxidación de las áreas cortadas. El desespinado generalmente se realiza a mano en la central de abasto del D.F.

Otro problema que se les presenta a los productores es cuando les solicitan nopal verdura desespinado, pues generalmente les piden 10 ó 20 toneladas a la semana, pero entregadas en un día, por lo que tendrían que contratar mucho personal para desespinar. Una alternativa que se está buscando es el de desespinado mecánico, existiendo aproximadamente 20 prototipos de desespadoras de nopales, uno de las más eficientes, se desarrolló en Michoacán, cuesta alrededor de 120,000 pesos y procesa 500 kilogramos por hora. El problema con esta última alternativa es que los nopales no son de forma heterogénea por lo que se perdería mucho tejido o el corte no sería regular.

4.3.3.2 En relación a la elaboración de productos de la industria alimentaria:

El mercado nacional prefiere consumir nopal fresco, es más barato y se encuentra disponible todo el año. Con frecuencia no se tiene plena conciencia de la importancia de estandarizar el proceso de acondicionamiento del producto antes de su procesamiento, principalmente en cuanto al tiempo y temperatura del escalde. Se debe tener presente que no

Finalmente, otro problema observado, es la falta de control del proceso en cuanto a sanidad, estabilidad de salmuera y fermentación, uniformidad del escabeche (en su formulación, nivel de vinagre y condimentos), y falta de control de calidad desde la recepción de la materia prima. En el proceso de salado las altas concentraciones de sal causan la corrosión de los elementos metálicos de la planta (Flores et al, 1995).

El nopal es un producto muy perecedero por presentar procesos degradativos acelerados e irreversibles debido a lesiones físicas como las rasgaduras de tejido por un mal corte. Cuando el nopal sufre algún daño, el tejido queda expuesto al medio ambiente y se vuelve más susceptible a la contaminación por microorganismos, lo cual se favorece aún más con el desespinado que elimina su epidermis la cual actúa no sólo como una barrera protectora natural contra la degradación microbiológica, sino también de la oxidativa causante del pardeamiento enzimático (Zamora, 2004).

4.3.4 Normas de calidad del nopal verdura

La existencia de normas de calidad que regulen los productos en general y específicamente para los nopales es conveniente para productores, comercializadores y consumidores, pues con ello los intercambios comerciales tienden a ser más justos, de manera que mayor calidad esté relacionada con mayor precio, aunque esto en la realidad se sesga por la ley de la oferta y la demanda (Flores et al, 1995).

Para la comercialización de nopal verdura existen dos normas:

- a) La Norma Oficial Mexicana NOM-FF-68-1988 (DGN-SECOFI). Ver anexo 1
- b) La Norma Codex Stan 185-1993 (Codex Alimentarius-FAO). Ver anexo 2

Como se ha mencionado, el nopal fresco se puede comercializar de dos diferentes maneras: 1) entero sin ningún tratamiento y, 2) desespinado y/o cortado.

La primera permite tener un producto que no se deteriore rápidamente ya que se ha visto que al desespinar el nopal se aceleran las reacciones de descomposición; por lo tanto, el nopal desespinado y/o cortado necesita un tratamiento químico para evitar estas reacciones (Ponce, 2003). Otra alternativa son los tratamientos físicos como el térmico; en nuestro caso no se puede

aplicar este método porque el objetivo es trabajar con nopales frescos y de esta manera no lo estarían.

4.3.5 Estudios previos para la conservación del nopal fresco

La importancia comercial que ha adquirido el nopal ha promovido el desarrollo de diversas investigaciones para aportar datos que mejoren su conservación y procesamiento.

Se han realizado trabajos de conservación de nopal verdura en refrigeración a una humedad relativa de 92 %, desespínándolo manualmente, escaldándolo a 80 °C por dos minutos y sumergiéndolo en una solución con 0.02 % de bisulfito de sodio y 0.6 % de ácido ascórbico, para posteriormente empacarlo en bolsas de polipropileno a una temperatura de 4 °C. Lo anterior permitió conservar el producto 17 días, sin presentar daños por frío, oscurecimiento enzimático y poca acumulación de mucílago en el empaque. Sin embargo luego de 17 días el producto presenta cambios desagradables en su textura, sabor, color, acidez y liberación de mucílago.

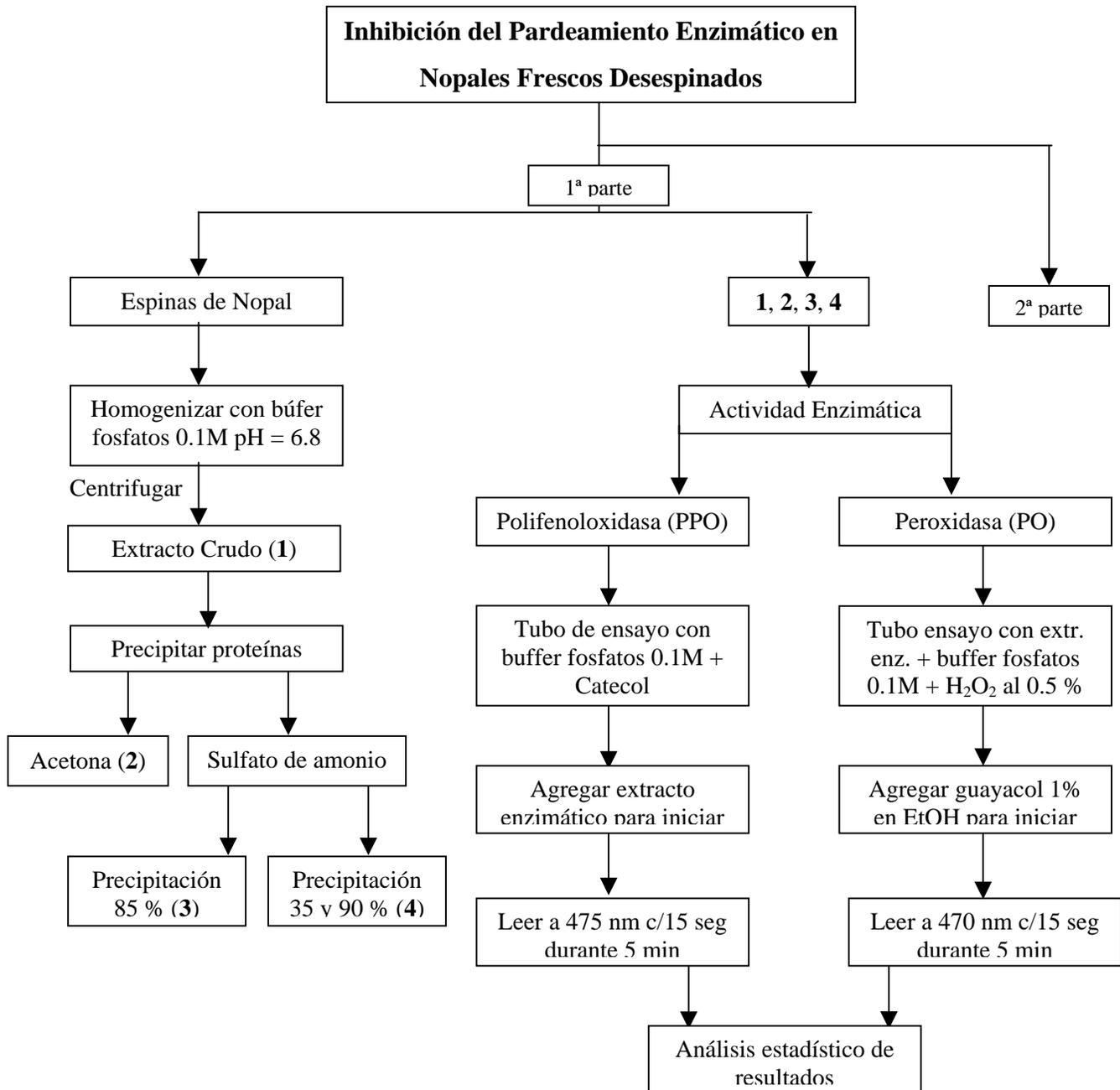
También se ha evaluado el comportamiento de los nopales irradiados con rayos gamma de cobalto 60 a dosis de 1.5 kGy y 2.0 kGy, envasados con y sin nitrógeno para disminuir la actividad de las enzimas responsables del deterioro y la flora microbiana presente en el producto. Con este método se logra una vida de anaquel de 20 días debido a que el nopal se deteriora por deshidratación, reblandecimiento y cambios en su coloración aunque si disminuye la cantidad de microorganismos (Zamora, 2004).

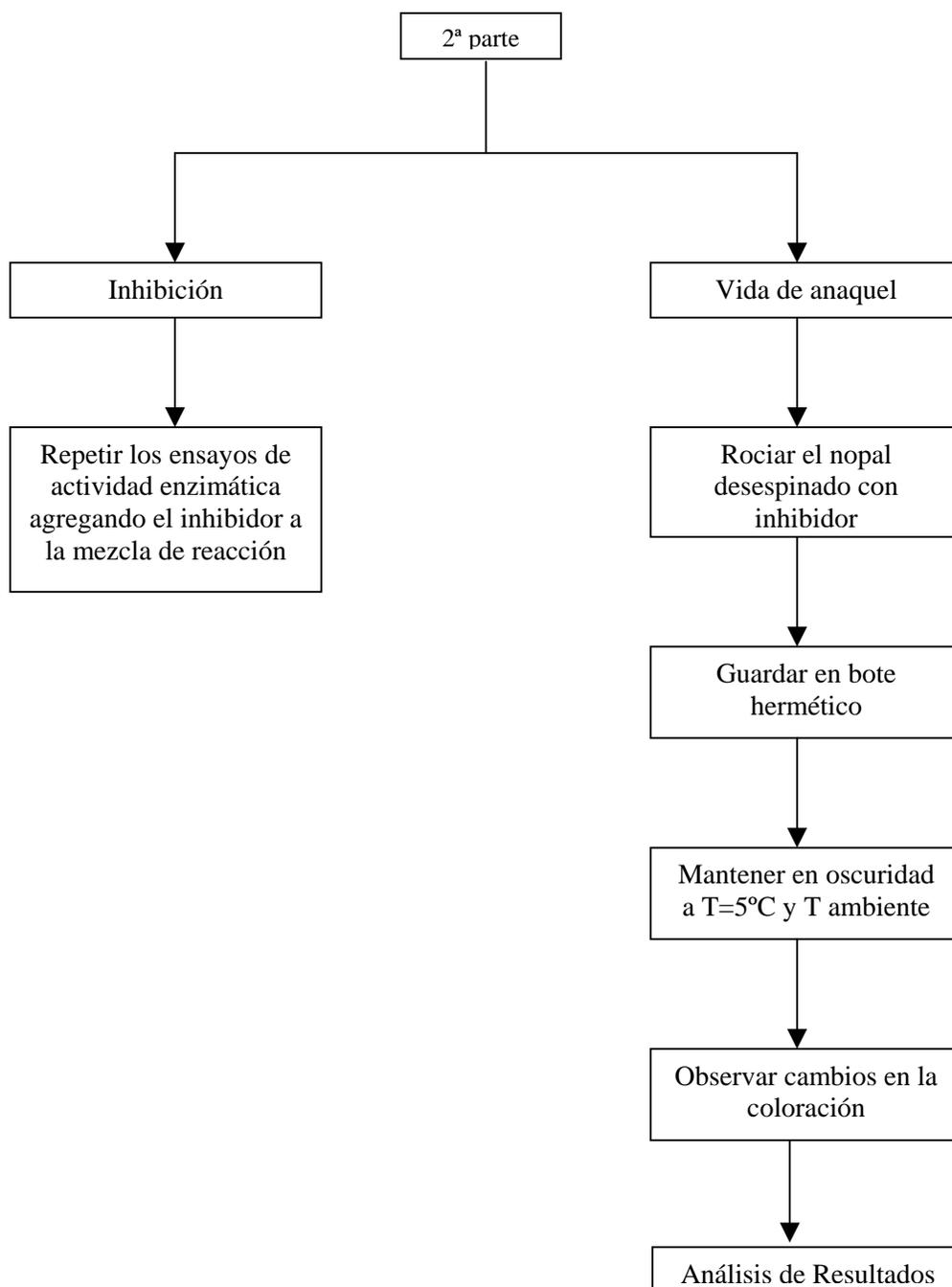
Los experimentos realizados por varios autores concluyen que es necesaria una rápida transportación y procesamiento en la metodología de conservación a fin de no alterar su eficiencia para evitar el pardeamiento enzimático, además con el empleo de desinfectantes se puede disminuir la carga microbiana que se encarga de degradar el producto, pero también puede

ser ventajoso aplicar un enfriamiento antes de procesarlos para disminuir la velocidad de las reacciones de deterioro causantes del reblandecimiento, pardeamiento y aparición del color verde olivo (Zamora, 2004).

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general de la investigación





5.2 Descripción de la metodología

Para una mayor facilidad de análisis del problema a resolver, el proyecto de la inhibición del pardeamiento enzimático del nopal se dividió en dos partes, la primera se enfocó a la determinación de la enzima que causa el pardeamiento y la obtención de un extracto enriquecido con dicha enzima. En la segunda etapa se estudió la respuesta de la enzima frente a diferentes inhibidores y la aplicación de los inhibidores al nopal desespinado.

5.2.1 PRIMERA PARTE.-

5.2.1.1 Obtención del extracto. Se obtuvo un extracto a partir de tres muestras: nopal desespinado (Figura 7), cladodio entero (Figura 8) y residuo del desespinado (Figura 9).



Figura 7. Nopal desespinado



Figura 8. Cladodio entero



Figura 9. Residuo del desespinado de nopal

Lo anterior se hizo pesando 100 gramos de muestra, se agregaron 300 ml de buffer (0.1M, pH 6.8) y se homogenizaron en licuadora durante un minuto. Posteriormente, el homogenizado se filtró con papel filtro Wathman 1 (Miller, 1998) en una cama de celita. El filtrado se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) (rotor JA-20, 20000rpm) durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Se desechó tanto el papel filtro como el precipitado obtenido de la centrifugación. Del sobrenadante se separaron cuatro volúmenes iguales (50 ml). Se tomó uno de estos volúmenes y se guardó a una temperatura de 0 °C, esta fracción fue elegida para ser el extracto crudo que serviría de referencia o control, con los demás. A las 3 alícuotas restantes se les aplicó uno de los tres métodos que se describen a continuación.

5.2.1.1.1 Precipitación de proteínas con Acetona fría.- Al volumen (50 ml) de extracto crudo se le agregó lentamente acetona fría hasta obtener una concentración de 60 % v/v. Esta operación debe llevarse a cabo en un baño de hielo porque la interacción solvente-agua es exotérmica y se trató de evitar o disminuir lo más posible la actividad de la enzima por efecto de la temperatura. Se dejó en reposo la mezcla durante 15 minutos hasta que se equilibró la temperatura y después se centrifugó a 5000 rpm por 7 minutos a una temperatura de 4 °C. Se guardó el sobrenadante para una examinación posterior. Finalmente se resuspendió el precipitado con la menor cantidad de buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.8) posible y se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína.

5.2.1.1.2 Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio (1 precipitación directa).- A los 50 ml de extracto crudo se le agregó sulfato de amonio hasta una saturación de 85 % (708 g/L) y se mantuvieron en agitación por 30 minutos a una temperatura de 4 °C. Transcurridos los 30 minutos, se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se guardó el sobrenadante para su posterior estudio. Se redisolvió el precipitado en buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.8).

Finalmente se hizo una diálisis con 150 ml de agua destilada por cada mililitro de disolución empleada. La diálisis se llevó a cabo manteniendo una agitación lenta durante 18 horas a 4 °C. Se utilizaron bolsas de diálisis de celulosa en 1 % de benzoato de sodio con tamaño de membrana de 1000 y un diámetro de 7.6 mm luego se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína de la muestra tratada en la diálisis.

5.2.1.1.3 Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio (2 precipitaciones).- A los 50 ml de extracto crudo se agregó sulfato de amonio hasta una saturación de 35 % (209 g/L) y se mantuvo en agitación por 3 horas a una temperatura de 4 °C. Después se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se llevó a 90 % de saturación con sulfato de amonio, manteniendo en reposo toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se guardó el sobrenadante para su posterior estudio. El precipitado se resuspendió en buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.8) y se hizo una diálisis con 150 ml de agua destilada por cada mililitro de disolución empleada. La diálisis se llevó a cabo manteniendo una agitación lenta durante 18 horas a 4 °C. Se utilizaron bolsas de diálisis de celulosa en 1 % de benzoato de sodio con tamaño de membrana de 1000 y un diámetro de 7.6 mm. Finalmente se determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína de la muestra tratada en la diálisis.

Luego se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática de las fracciones obtenidas (tanto precipitados como sobrenadantes finales) en los métodos empleados, así como al extracto crudo inicial. En total son tres precipitados, tres sobrenadantes y el extracto crudo.

5.2.1.2 Determinación de proteína. La determinación de proteína se realizó aplicando el método de Lowry el cual se basa en la formación del color azul del cobre cuando forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas en condiciones básicas y la reducción del reactivo de Folin por los radicales de la tirosina y el triptofano.

Experimentalmente, el ensayo consistió en preparar tubos con los siguientes reactivos: agua, desoxicolato de sodio 0.15 %, lauril sulfato 10 %, hidróxido de sodio 0.8N y el reactivo de Folin (diluido 1 en 5 partes). Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 750 nm. Esta metodología se llevó a cabo realizando una curva patrón con albúmina sérica bovina como estándar y un blanco de reactivos tratados de la misma manera que la muestra.

5.2.1.3 Determinación de la actividad enzimática.

5.2.1.3.1 Ensayo del catecol para PPO: Es un ensayo espectrofotométrico que se basa en el monitoreo del sustrato mediante su absorbancia. De esta manera se observa la disminución en la concentración mientras se van formando las quinonas que son las responsables del color pardo. El sustrato que se utiliza para este tipo de ensayo puede ser un monofenol (como la tirosina: *p*-hidroxifenilamina) o un difenol, como la DOPA (dihidroxifenilalanina) o el catecol (Clyde, 1989). En este caso se utilizó el catecol como sustrato y la longitud de onda a la que absorben estos compuestos fenólicos una vez oxidados es de 475 nm. El ensayo fue de la siguiente manera: Se prepararon tubos con los siguientes reactivos (buffer de fosfatos 0.1M para mantener el pH en 6.8 y catecol (4 mg/ml) en diferentes concentraciones). Se inició la reacción adicionando la misma cantidad del extracto obtenido, después se prepararon tubos con una concentración constante de catecol y se varió la del extracto. La actividad se determinó en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 475 nm usando como blanco agua destilada en cada ensayo. Se tomaron lecturas cada 15 segundos durante 5 minutos. Como medida de control y comprobación del método se realizó la misma determinación con un alimento rico en PPO como lo es la papa.

5.2.1.3.2 Ensayo de guayacol para PO: Se basa en una reacción colorida utilizando guayacol como sustrato y H₂O₂ como donador de hidrógeno. La presencia de la peroxidasa conduce al

desarrollo de una coloración rojiza (tetraguayacol) en la mezcla de reacción, la cual se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 470 nm (Heid, 1963).

Para montar este ensayo se procedió de la siguiente manera: Se colocó 1 ml de extracto enzimático de espinas de nopal en un tubo de ensayo, se adicionó 1 ml de buffer de fosfatos y 0.2 ml de H₂O₂ al 0.5 %, para iniciar la reacción, se agregó 0.2 ml de guayacol al 1 % en etanol (95 %). Se determinó el tiempo en que tarda en iniciar la reacción y la intensidad de la coloración rojiza siendo el blanco una mezcla de reacción sin guayacol. Como medida de control y comprobación del método se realizó la misma determinación con un alimento rico en PO como lo es la col (Ponce, 2003).

Para obtener datos actividad enzimática se aplicó la Ley de Lambert-Beer ($Abs = C\epsilon l$), siendo el coeficiente de absortividad molar del tetraguayacol a esta longitud de onda (470 nm) de $\epsilon_{470} = 2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.2.2 SEGUNDA PARTE.-

5.2.2.1 Pruebas de inhibición. En esta segunda etapa se realizaron las pruebas de inhibición de la enzima presente, la peroxidasa (PO). Para ello se utilizaron las metodologías ya descritas para la determinación de la actividad enzimática pero agregando 0.2 ml del inhibidor a diferentes concentraciones en cada uno de los ensayos, de 0.05 a 0.6 % v/v y manteniendo la misma concentración de extracto en todos los casos.

Se varió la concentración del inhibidor y se evaluó su efecto monitoreando la absorbancia de la reacción en un tiempo de cinco minutos. La longitud de onda a la que se midió la absorbancia fue de 470 nm porque la enzima presente en el nopal es la PO. Además se comparó con un control de la enzima sin inhibidor el cual indicó la efectividad del inhibidor utilizado. Los inhibidores utilizados pertenecen al grupo de los flavonoides y de los ácidos hidroxicinámicos.

5.2.2.2 Vida de anaquel de los nopales frescos desespinaados. Finalmente, una vez determinado el inhibidor más adecuado y su concentración mínima efectiva, se determinó la vida de anaquel de los nopales frescos desespinaados aplicándoles dicho inhibidor en solución acuosa a la concentración encontrada. Los inhibidores se agregaron al nopal con un aspersor cuidando extenderlo por toda la pieza y no excederse porque podría humedecer el nopal lo cual favorecería su descomposición.

Posteriormente, los nopales rociados con el inhibidor se almacenaron en bolsas herméticas y se guardaron evitando la exposición a la luz porque ésta acelera las reacciones de descomposición como la pérdida de color característico del nopal.

La vida de anaquel se determinó mediante una evaluación visual del cambio en la coloración inicial (pérdida del color verde brillante). Estas pruebas de vida de anaquel se llevaron a cabo a temperatura de refrigeración (7 °C) y temperatura ambiente (20 °C).

6. MATERIALES Y EQUIPO

6.1 Material Biológico

Nopales desespinados (*Opuntia ficus-indica*) Variedad Milpa Alta

Albúmina sérica bovina 90-95 % pureza

6.2 Material Químico

Acetona (grado analítico, Química Meyer); ácido caféico (Sigma); ácido cumárico (Sigma); ácido ferúlico (Sigma); alcohol etílico (grado analítico, Química Meyer); carbonato de sodio (99.5 % pureza, Reasol); catecol (>98 %, Fluka AG Buchs); Desoxicolato de sodio (reactivo analítico); fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 (J.T. Baker); fosfato de potasio monobásico K_2HPO_4 (J.T. Baker); guayacol (Sigma); hidróxido de sodio (>97 % pureza, High Purity); peróxido de hidrógeno (30 %, Reactivos y productos químicos finos); reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (Hycel de México); SDS Lauril sulfato de sodio (99 % pureza, Sigma); sulfato cúprico pentahidratado $CuSO_4 \cdot H_2O$ (J.T. Baker); sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ (grado analítico, Merck); sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ (grado técnico, Reasol); Tartrato de sodio potasio tetrahidratado $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (>99 % pureza, Sigma)

6.3 Equipo

Centrifuga Beckman J2-21M/E ((rotor JA-20, 20000rpm)

Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 Milton Roy

Micropipetas Gilson 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inhibición del pardeamiento enzimático del nopal se determinó en dos partes como se describe en la metodología. A continuación se presentan los resultados de ambas partes.

7.1 PRIMERA PARTE

Se determinó la enzima responsable del pardeamiento del nopal verdura midiendo la actividad enzimática de la polifenoloxidasas (PPO) y de la peroxidasa (PO) en el extracto crudo.

Como extracto crudo se consideró una muestra del nopal desespinado (Figura 7), una muestra del cladodio entero (Figura 8) y una muestra de puro residuo del desespinado del nopal (Figura 9). De estos tres extractos se obtuvo que hay una mayor actividad enzimática en el residuo del desespinado de nopal que en las otras dos muestras. Lo anterior puede deberse a que la enzima esté más concentrada cerca de las espinas o en la superficie del nopal. Se observó que cuando se utiliza una muestra en la que predominan las espinas tenemos mayor cantidad de proteína y de actividad enzimática por lo que estas estructuras están enriquecidas en esta enzima, la peroxidasa. Por lo tanto se utilizó esta porción del nopal para el obtener el extracto crudo.



Figura 7. Nopal desespinado



Figura 8. Cladodio entero



Figura 9. Residuo del desespinado de nopal

En esta determinación de la actividad enzimática se obtuvo, por un lado, que en nuestras condiciones no se observó actividad de PPO en el extracto crudo durante los cinco minutos que se monitoreo la reacción. Por otro lado, el ensayo para determinar la presencia de PO mostró que sí hay actividad en el extracto crudo. La actividad iniciaba inmediatamente después de agregar el sustrato (guayacol) al extracto crudo.

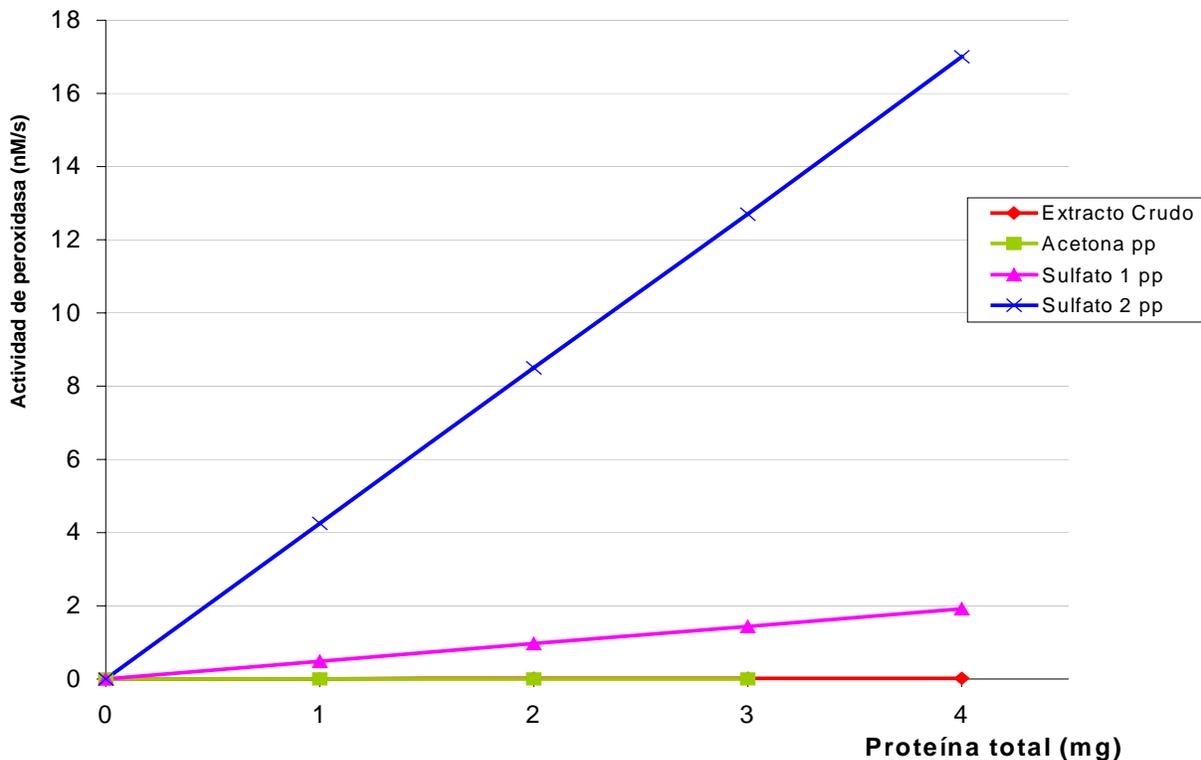
En el nopal, con y sin espinas, no hay actividad de la PPO debido a dos posibles razones, la primera que la concentración sea tan baja que no hay percepción de la actividad, y la segunda, que la PPO no esté presente en el nopal. Para descartar alguna de estas opciones, se repitieron los ensayos aumentando la concentración del extracto y por lo tanto la de la enzima. El resultado fue el mismo, no hubo actividad de PPO por lo tanto se descartó la posibilidad de que hubiera PPO en el nopal. Los ensayos de PO, al obtener un resultado positivo, afirman la presencia de PO en el nopal. Aunque el pardeamiento enzimático es causado principalmente por la PPO, también puede deberse a una PO. Entre las frutas y verduras que presentan pardeamiento enzimático a causa de una PO se encuentran el rábano, la fresa y la col (Tabla 4). Así se observa que el nopal no es un caso aislado de pardeamiento enzimático por una PO.

Después de determinar que la enzima presente en el nopal es la Peroxidasa (PO), se procedió a hacer una purificación parcial de la enzima siguiendo el procedimiento de Singh (2003). Los procedimientos empleados fueron la precipitación de proteínas con acetona y con sulfato de amonio, éste último procedimiento se implementó dos veces, una saturando al 85 %, y otra saturando primero al 35 % y luego al 90 %. A cada uno de los precipitados obtenidos se le midió la actividad de PPO y de PO, como resultado de estas evaluaciones se encontró que solamente el precipitado con acetona no mostró actividad de PO (gráfica 2). Los precipitados obtenidos con sulfato de amonio presentaron actividad de PO siendo el de mayor actividad

específica el que se obtuvo de la doble precipitación con la sal de amonio, es decir, conforme se fue purificando el extracto crudo se fue presentando mayor actividad de la PO.

Gráfica 2. ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA EN LOS PRECIPITADOS OBTENIDOS EN LOS DISTINTOS MÉTODOS

Acetona: Sat. 60% v/v acetona-extracto crudo, 4 °C, 5000 rpm, 7 min,
 Sulfato 1 pp: Sat. 85 % p/v, 4 °C, 5000 rpm, 15 min
 Sulfato 2 pp: Sat. 35-90 % p/v, 4 °C, 5000 y 8000 rpm, 15 min



* El Extracto Crudo presenta una actividad cercana a 0

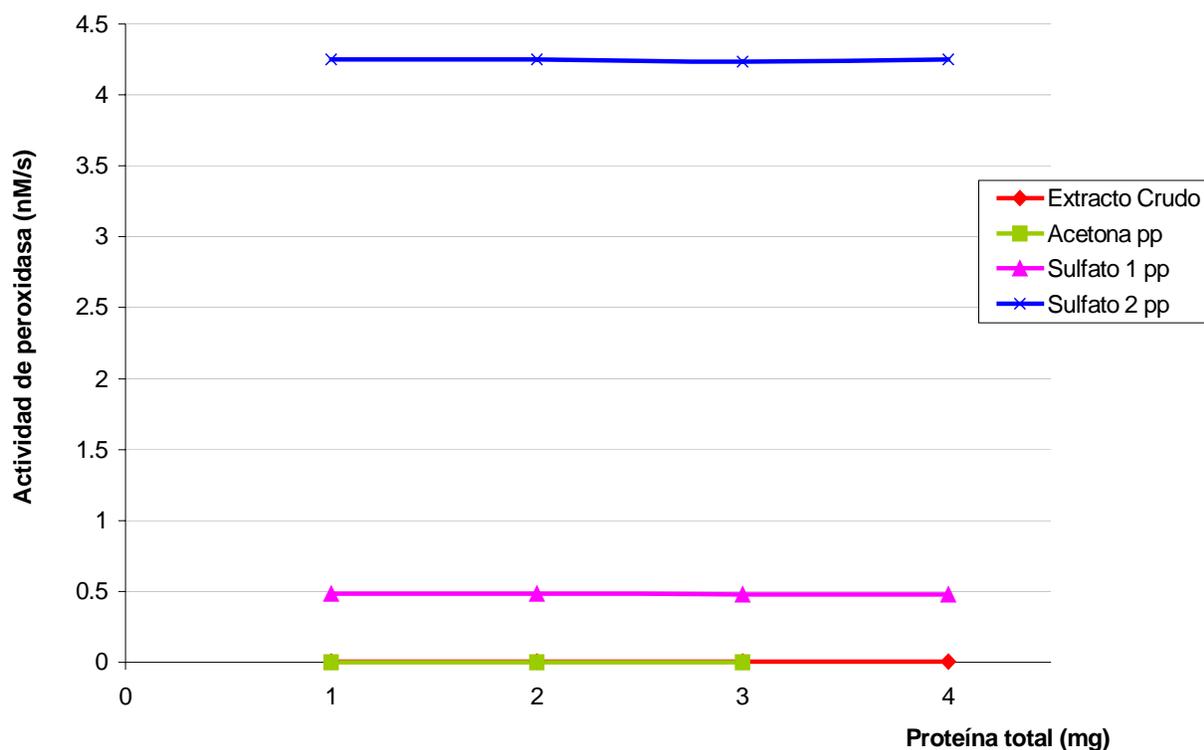
* El precipitado obtenido en el método con Acetona no presentó actividad.

Respecto a las determinaciones de actividad de PO hechas a los sobrenadantes de los tres métodos se obtuvo que el sobrenadante de la acetona es el que presenta mayor actividad de PO, seguido de los sobrenadantes de los métodos con sulfato de amonio de 1 y 2 precipitaciones. Esto indica que la enzima no se precipitó con la acetona a esa concentración. No se aumentó la concentración de disolvente porque existe el riesgo de desnaturización de la enzima (Scopes, 1986).

Se determinó la actividad específica de la PO (Actividad / mg Proteína) de los precipitados obtenidos así como la del extracto crudo (gráfica 3). Como se observa en la gráfica 3, la actividad específica de la PO en cada precipitado obtenido se mantuvo constante al agregar al ensayo diferentes concentraciones de proteína, en las condiciones para la medición de actividad de PO que empleamos.

Gráfica 3. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PEROXIDASA EN LOS PRECIPITADOS OBTENIDOS EN LOS DISTINTOS MÉTODOS

Acetona: Sat. 60% v/v acetona-extracto crudo, 4 °C, 5000 rpm, 7 min,
 Sulfato 1 pp: Sat. 85 % p/v, 4 °C, 5000 rpm, 15 min
 Sulfato 2 pp: Sat. 35-90 % p/v, 4 °C, 5000 y 8000 rpm, 15 min



* El Extracto Crudo presenta una actividad específica promedio de 0.0045
 * El precipitado del método con Acetona no presentó actividad alguna.

El método de extracción con el que se obtuvo mayor purificación de la actividad fue la precipitación de proteínas saturando con sulfato de amonio al 35 y 90 % (tabla 6). Para la determinación de este enriquecimiento se consideró la actividad enzimática específica del Extracto Crudo como 1 (tabla 6)

Tabla 6. Actividad específica de Peroxidasa en los precipitados de los tres métodos

Método / Precipitado	Actividad Específica $\eta\text{mol}/\text{min}/\text{mgProteína}$	Purificación de la actividad de PO
Extracto Crudo	0.27 ± 0.00023	1
Acetona	---	---
Sulfato de amonio 85 %	28.86 ± 0.00144	107
Sulfato de amonio 35-90 %	255 ± 0.00833	944

Después de la purificación parcial, también se determinó el rendimiento de proteína total a cada precipitado obtenido en los tres métodos de purificación el contenido de proteína, mediante el método de Lowry, y se observó que el extracto crudo es el que contiene mayor cantidad de proteína, seguido de los métodos de sulfato de amonio con una y con dos precipitaciones respectivamente (tabla 7). En el método para precipitar proteínas con acetona sí se obtuvo un precipitado pero la cuantificación de proteína arrojó un valor de cero.

Tabla 7. Proteína contenida en los precipitados de los tres métodos de purificación

Método / Precipitado	Rendimiento de Proteína (mg/ml)
Extracto Crudo	10.68 (100 %)
Acetona	0.00 (0 %)
Sulfato de amonio 85 %	8.9×10^{-2} (0.83 %)
Sulfato de amonio 35-90 %	7.4×10^{-3} (0.07 %)

Los resultados de la tabla 7 no indican necesariamente que toda la proteína sea enzima en cada fracción. Evidentemente, el extracto contiene otras proteínas y sustancias propias del nopal que pudieran intervenir en la determinación de proteína, aunque ya se hayan perdido algunas en el filtrado o las centrifugaciones.

En los precipitados de los métodos con sulfato de amonio hay mucho menor contenido proteínico porque estos precipitados ya han pasado por procesos de purificación como la precipitación de proteínas y la diálisis; la diferencia entre estos dos precipitados radica en la cantidad de proteína obtenida debido a que el método con dos diferentes saturaciones de sulfato de amonio fue selectivo ya que en la primera saturación se eliminaron las proteínas y compuestos poco solubles. En cuanto a no obtener proteínas por el método con acetona se puede deber a dos razones. Por un lado la cantidad de acetona utilizada no fue suficiente y tal vez con una mayor saturación se podrían obtener las proteínas y, por otro lado, el solvente o la cantidad de solvente pudieron haber desnaturalizado la proteína (Whitaker, 1972).

Tabla 7. Comparación de actividad específica con otros autores

	Método / Precipitado	Proteína (mg)	Actividad Específica (mM/min/mg Prot)*
Padiglia, et al (1995)	Extracto Crudo	390	128.3
	Sulfato de amonio 90 %	310	151.3
	Método / Precipitado	Proteína (mg/ml)	Actividad Específica (mM/min/mg Prot)
A. Khales, M. (2005)	Extracto Crudo	6.4	38.0
	Método / Precipitado	Proteína (mg/ml)	Actividad Específica (ηmol/min/mg Prot)
Muestra actual	Extracto crudo	10.68	0.27
	Sulfato de amonio 85 %	8.9×10^{-2}	28.86
	Sulfato de amonio 35-90 %	7.4×10^{-3}	255

U = cantidad de enzima que se requiere para producir un cambio en la Abs de 0.1 a 460 nm/min

* Sustrato utilizado = o-dianisidine (22mM) y H₂O₂ (12mM) en buffer de NaOAc (100mM), pH 5.75

Padiglia, et al. (1995) y A. Khales (2005) reportan un análisis de la PO del nopal en el cual se determina la actividad específica utilizando o-dianisidina, un sustrato diferente al que se utilizó en este trabajo. Se observa que la actividad específica del extracto crudo obtenido es menor al que obtuvieron Padiglia (1995) y Khales (2005). Esto nos indica la forma en que se obtuvo el extracto crudo resulta con más interferencias que el método empleado en el trabajo de Padiglia (1995). También influyen la especie de nopal utilizado y la madurez del cladodio al momento de ser cortado en la cantidad de enzima. Posteriormente, el precipitado que se obtuvo con sulfato de amonio saturando al 85 % muestra actividad específica menor a la que reportó Padiglia (1995), esta diferencia puede deberse a que el punto de precipitación de la enzima se logra al saturar hasta 90 % con la sal de amonio y no usando 85 %. Por último, se observa que la

actividad específica obtenida del método con las dos precipitaciones sucesivas es mayor a la que reporta Padiglia (1995), esto es debido a que la primera precipitación elimina a las proteínas de menor solubilidad que son las mayor tamaño y al llevar la saturación al 90 % se obtiene un precipitado con proteínas de menor tamaño que es donde está nuestra enzima, es decir se concentra la enzima y se ve reflejado en la actividad específica.

Basándose en estos primeros resultados se utilizó el precipitado obtenido del método con sulfato de amonio a 35 y 90 % de saturación en las determinaciones posteriores.

En lo posterior cuando se haga mención del extracto proteínico, se referirá al precipitado obtenido del método con sulfato de amonio a 35 y 90 % de saturación aclarando que este extracto no es totalmente proteínico porque su purificación no ha sido al 100 %, y por lo tanto contiene otras sustancias que pudieron haberse precipitado junto con las proteínas.

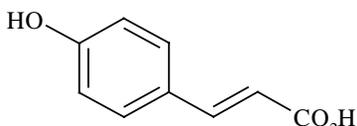
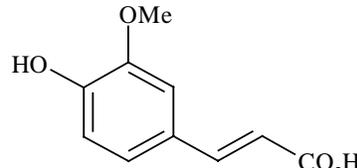
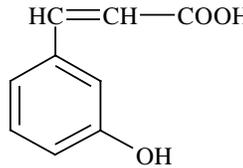
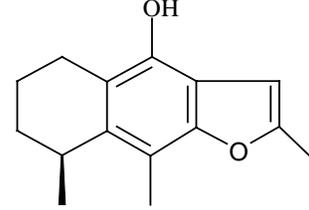
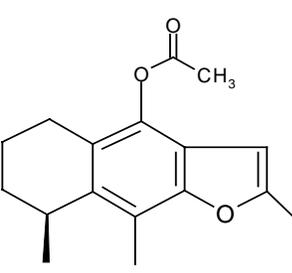
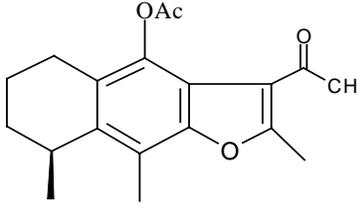
SEGUNDA PARTE

Pruebas de Inhibición

Se inició determinando la cantidad de extracto proteínico necesario para obtener una absorbancia de 0 a 0.9 (470 nm) durante los 5 minutos que se llevó el monitoreo. Estas condiciones fueron para poder visualizar el decremento de la actividad cuando se utilizaran los inhibidores. La cantidad necesaria de este extracto para las condiciones mencionadas fue de 0.3 ml (0.002 mg de proteína total). Una vez obtenida la cantidad de extracto proteínico, se montó el ensayo de guayacol para determinar la actividad de PO en presencia de inhibidores, quedando de la siguiente manera: 1.5 ml de buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.8), 0.3 ml de extracto proteínico, 0.2 ml de peróxido de hidrógeno 0.5 %, 0.2 ml de guayacol 1 % y 0.2 ml de inhibidor. El ensayo se montó a diferentes concentraciones de inhibidor manteniendo la misma cantidad agregada al ensayo, es decir siempre se agregaron 0.2 ml de inhibidor.

Se probaron once compuestos como inhibidores de la PO de nopal, estos compuestos pertenecen a las familias de los hidroxicinamatos y a los flavonoides. Debido a que algunos son de importancia comercial y en proceso de patente se identificarán como inhibidor **1**, inhibidor **2**, inhibidor **3**, inhibidor **4** e inhibidor **5**. Así como ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido caféico, cacalol, acetato de cacalol y 2-acetilacetato de cacalol.

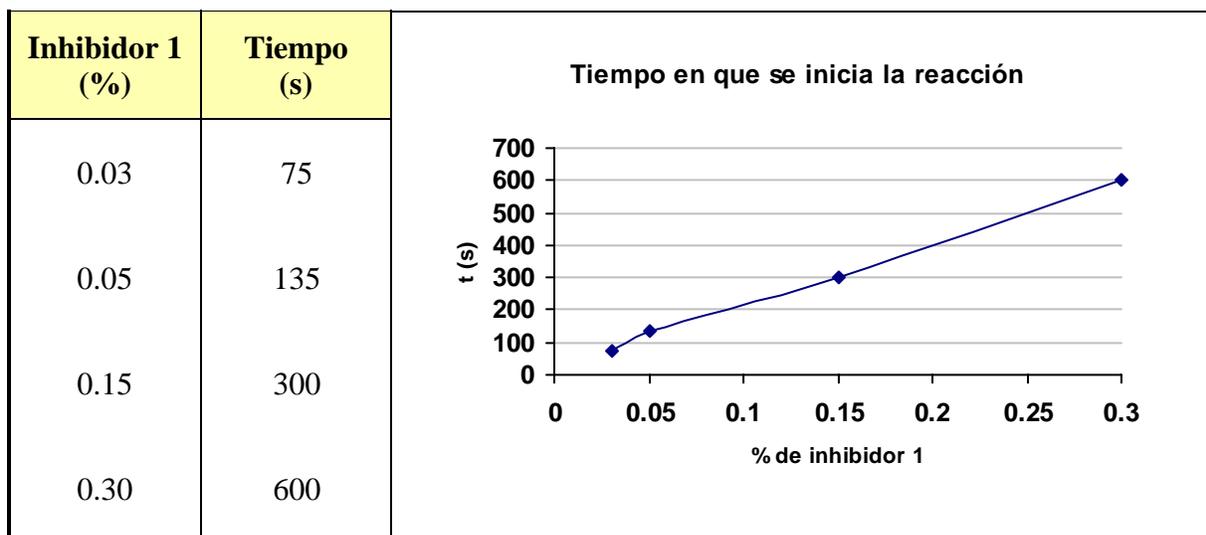
Tabla 9. Compuestos probados como Inhibidores

Compuestos	Estructuras	
Ácido Ferúlico		
Ácido Cumárico	Ácido <i>p</i> -Cumárico	Ácido Ferúlico
Ácido Caféico		
Cacalol	Ácido Caféico	Cacalol
Acetato de Cacalol		
2-Acetilacetato de Cacalol	Acetato de Cacalol	2-acetilacetato de Cacalol
Inhibidor 1		
Inhibidor 2		
Inhibidor 3		
Inhibidor 4		
Inhibidor 5		

De estos ensayos se obtuvo que los ácidos ferúlico, caféico y cumárico son sustratos de la enzima en vez de ser inhibidores ya que aceleraron la reacción (gráfica 4), estos tres compuestos desarrollaron un color rojo ladrillo en un tiempo menor a los cinco minutos de monitoreo.

Los demás compuestos evaluados mostraron actividad de inhibición de la peroxidasa del nopal (gráfica 4), excepto el 2-acetilacetato de cacalol. El inhibidor **1** mantuvo en cero la actividad de la enzima hasta cierto tiempo en que se dispara la reacción y comienza la coloración, este tiempo depende de la concentración del inhibidor, entre más cantidad de inhibidor haya, más tiempo de inhibición se tendrá (Tabla 10).

Tabla 10. Tiempo en que se inicia la reacción con el inhibidor **1**



Los inhibidores del pardeamiento enzimático se clasifican en cinco grupos: I) agentes reductores, II) agentes quelantes de metales, III) acopladores de quinonas, IV) análogos al sustrato y V) otros inhibidores. Los grupos I y III interactúan con los productos de la reacción enzimática para evitar la formación de los compuestos coloridos, las melanoidinas. En cambio, los grupos II, IV y V interactúan con la enzima para inhibir su actividad.

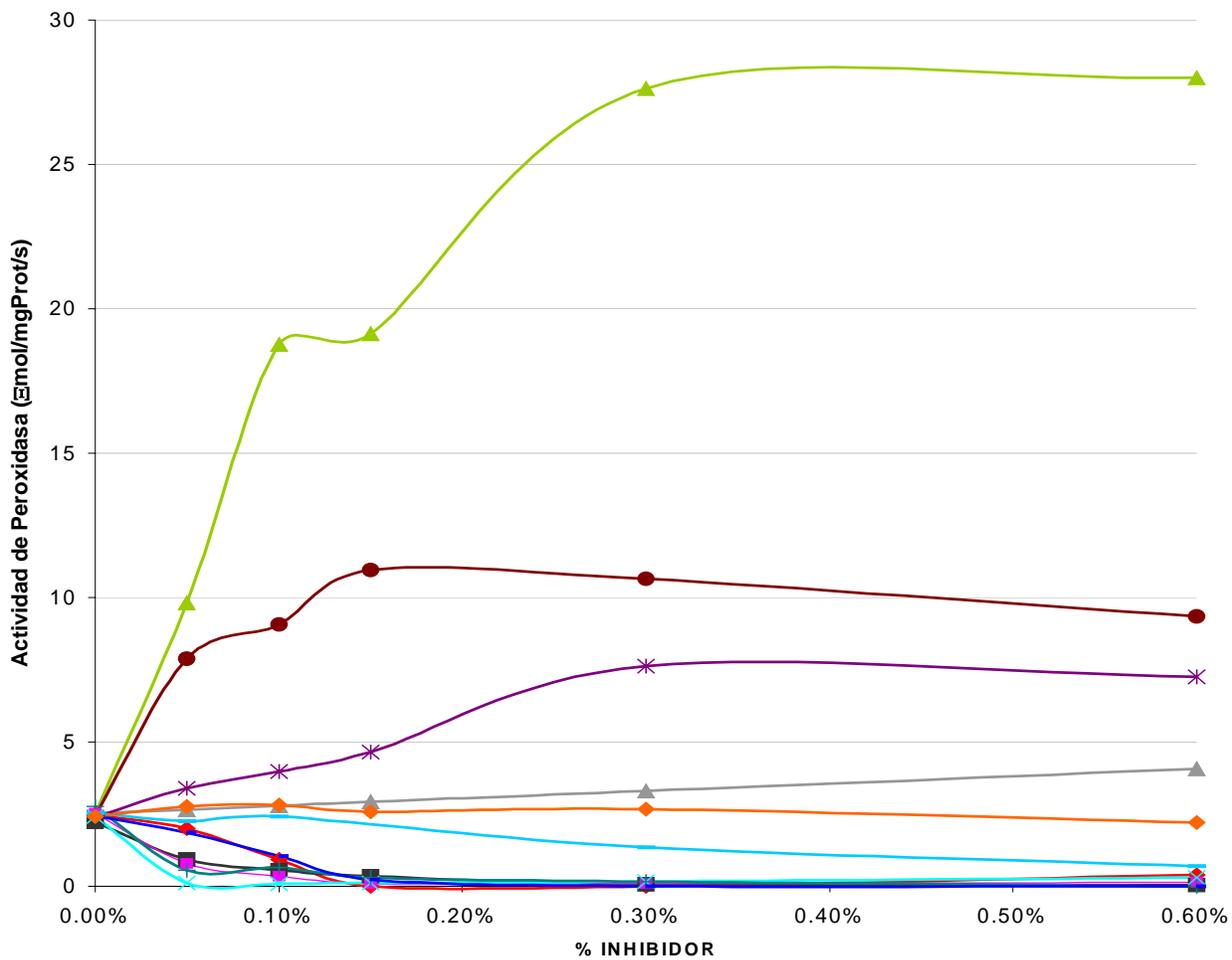
La acción del inhibidor **1** es reducir las quinonas producidas por la enzima haciendo reversible la reacción, la reacción se dispara cuando se termina la cantidad de inhibidor **1** en el medio permitiendo la acumulación de quinonas y la formación de la melanoidinas que son las responsables del color café-rojizo del pardeamiento enzimático.

En cambio, los demás compuestos inhibieron la PO de una manera diferente ya que no evitaron la reacción por completo como lo hizo el inhibidor **1** sino que redujeron su actividad evitando una coloración instantánea del medio de reacción. El compuesto con menor acción inhibitoria fue el acetato de cacalol mientras que el 2-acetilacetato de cacalol no funcionó ni como sustrato ni como inhibidor. Esta diferencia entre el cacalol y sus derivados es porque se han protegido los fenoles del compuesto con acetatos, comprobando que el cacalol está funcionando como un inhibidor análogo al sustrato. Por lo tanto al proteger a los fenoles del cacalol disminuye la capacidad de inhibir la reacción; es por eso que el acetato de cacalol tiene menor poder de inhibición mientras que el 2-acetilacetato no inhibe la reacción pero tampoco la estimula. Cabe mencionar que el inhibidor **5** y el cacalol son buenos inhibidores pero son compuestos poco solubles en pH neutro por lo que se disolvieron a pH básico (8) y se agregaron al ensayo. Este pH básico no afectó el pH al que se estaba trabajando (6.8) porque el volumen de inhibidor es mucho menor que el de buffer.

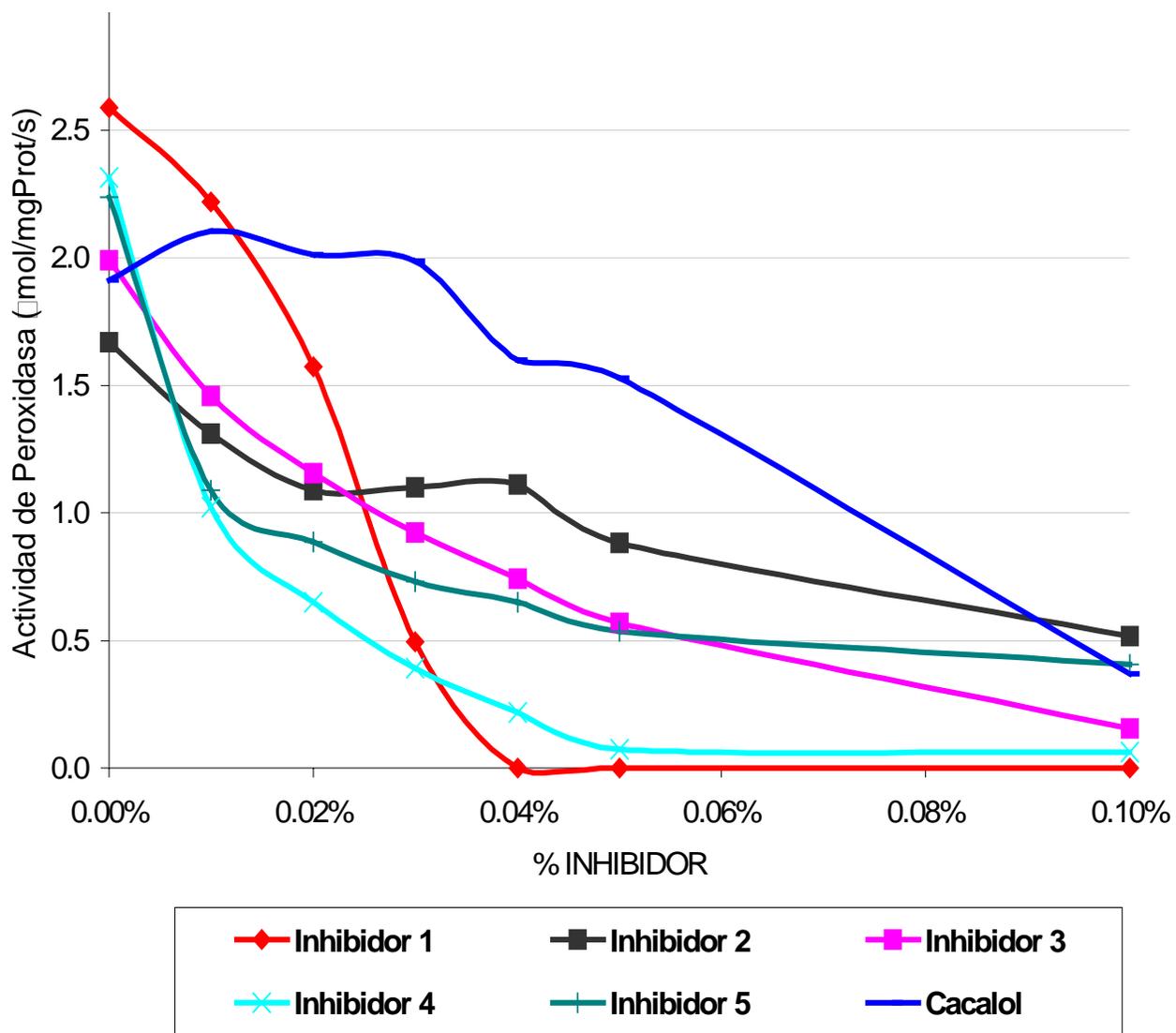
En la gráfica 4 se puede ver que la inhibición de la PO es desde 0.10 % de inhibidor por lo que se repitieron los ensayos haciendo un barrido menor en las concentraciones de los inhibidores, este barrido consistió en concentraciones desde 0 hasta 0.10 % de inhibidor.

En la gráfica 5 se puede observar mejor la relación del inhibidor con la actividad enzimática. En todos los casos la actividad enzimática de la PO disminuyó conforme se fue aumentando la cantidad de inhibidor, excepto con el cacalol que se mantuvo constante hasta 0.03 % que es cuando comienza a disminuir.

El compuesto con mejor inhibición fue el inhibidor **1** que lleva la actividad a cero cuando tiene una concentración de 0.04 %, le siguen los inhibidores **4**, **3**, **5** y **2**



Gráfica 4. COMPUESTOS PROBADOS EN LA ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA DEL NOPAL



Gráfica 5. COMPUESTOS QUE PRESENTARON INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA DEL NOPAL

Vida de anaquel

Con base a los resultados de las pruebas de inhibición se escogieron a los compuestos **1**, **5** y **3** como inhibidores para probarlos en el nopal recién desespinado. No se eligió el cacalol porque es un compuesto poco soluble en las condiciones en las que se está trabajando. Además la obtención del cacalol no es económica ya que se extrae de la raíz de *Psacalium decompositum*, planta endémica de la sierra Tarahumara y el rendimiento es de 7mg/kg de raíz (González, et al, 2005). Lo anterior convierte al cacalol en un compuesto poco viable para resolver el problema del pardeamiento enzimático.

Los inhibidores **2** y **3** son extraídos con un buen rendimiento de una semilla abundante en México por lo que si es viable su utilización.

Los inhibidores elegidos se aplicaron a una concentración de 0.05 % a nopales recién desespinaados, se empacaron en bolsas selladas y se guardaron en la oscuridad para evitar que factores como la luz y el oxígeno del ambiente aceleraran la reacción. Lo anterior se hizo con cada inhibidor y un control sin inhibidor. Se hicieron tres lotes (nopal grande, mediano y chico), cada uno con 5 nopales tanto para temperatura ambiente como para temperatura de refrigeración (7 °C). Los resultados fueron:

a) temperatura ambiente: desde el primer día hubo pérdida de color verde brillante en los nopales grandes y presencia de mucílago en los nopales medianos para los nopales con inhibidor **5**, inhibidor **3** y el control. Para el caso del inhibidor **1** solamente se pierde el color verde brillante en los nopales grandes mientras que los nopales medianos y chicos no tuvieron cambios. Para el segundo día se observan pequeñas manchas color rojizo alrededor de la zona por donde se hizo el corte del desespinado para todos los inhibidores y lotes. Finalmente, al

tercer día el pardeamiento enzimático era muy evidente y algunos lotes incluso presentaron descomposición microbiana.

- b) temperatura de refrigeración: los nopales mantuvieron sus características iniciales hasta el segundo día en el cual comenzaron a mostrar inicios de oscurecimiento mostrando ligeras coloraciones alrededor de la zona de corte para todos los inhibidores en los tres lotes, estas manchas se fueron intensificando hasta el cuarto día en el que la coloración parda ya era muy intensa y los nopales poco atractivos, ningún lote presentó descomposición microbiana.

Como se observa la vida de anaquel fue demasiado corta por lo que se repitió considerando un exceso de 0.3 % en la concentración del inhibidor.

El tamaño de los nopales no fue un factor determinante para la aparición del pardeamiento enzimático, ya que en los tres tamaños se presentó casi al mismo tiempo. Además, probablemente los nopales tenían la misma madurez por lo que la cantidad de enzima pudo ser similar. Por lo anterior se decidió solamente hacer dos lotes de cinco nopales de diferentes tamaños para cada inhibidor. También se cambió el inhibidor **5** por el inhibidor **2** debido a las dificultades que se tiene con este compuesto para ser solubilizado a pH neutro y para verificar si el inhibidor **2** puede ser utilizado y reducir costos en su aplicación.

Tabla 11. Vida de anaquel de nopales desespinaados usando inhibidor al 0.3 %.

Temperatura ambiente 25 °C

	T ambiente	Lote 1	Lote 2
Día 1	<i>Control</i>	Ligera pérdida de color verde brillante	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		
Día 2	<i>Control</i>	Ligera pérdida de color verde brillante	
	<i>Inhibidor 1</i>	Mayor pérdida de color verde brillante	
	<i>Inhibidor 2</i>	Ligera pérdida de color verde brillante	
	<i>Inhibidor 3</i>	Ligera pérdida de color verde brillante	
Día 3	<i>Control</i>	Pérdida de color verde brillante, primeras manchas visibles del pardeamiento alrededor de la zona de corte del desespinaado	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		
Día 4	<i>Control</i>	Pérdida de color verde brillante, aumento de tamaño y de intensidad en las manchas del pardeamiento alrededor de la zona de corte del desespinaado	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		
Día 5	<i>Control</i>	Inicio de la descomposición por hongos. Pardeamiento en todas las piezas. Presencia de mucílago. Desecho de nopales	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		

Tabla 12. Vida de anaquel de nopales desespinaados usando inhibidor al 0.3 %. Temperatura 7 °C

	T refrigeración	Lote 1	Lote 2
Día 1	<i>Control</i>	No hay cambios	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		
Día 2	<i>Control</i>	No hay cambios	
	<i>Inhibidor 1</i>	Verde brillante disminuye	
	<i>Inhibidor 2</i>	No hay cambios	
	<i>Inhibidor 3</i>	No hay cambios	
Día 3	<i>Control</i>	No hay cambios	
	<i>Inhibidor 1</i>	Disminución de verde brillante	
	<i>Inhibidor 2</i>	No hay cambios	
	<i>Inhibidor 3</i>	No hay cambios	
Día 4	<i>Control</i>	Disminución en el color verde brillante	
	<i>Inhibidor 1</i>	Pérdida de color verde brillante	
	<i>Inhibidor 2</i>	Ligera disminución de verde brillante	
	<i>Inhibidor 3</i>	Ligera disminución de verde brillante	
Día 5	<i>Control</i>	Pérdida de color verde brillante, ligeras manchas de pardeamiento. Humedad	
	<i>Inhibidor 1</i>	Ligeras manchas alrededor de la zona del desespinado	
	<i>Inhibidor 2</i>	Ligeras manchas de pardeamiento en la zona del desespinado en 3 piezas, 1 pieza con descomposición por la humedad	
	<i>Inhibidor 3</i>	Disminución del color verde brillante, 1 pieza con ligeras manchas alrededor del desespinado	
Día 6	<i>Control</i>	Presencia de mucílago, oxidación por humedad en 4 de las piezas	
	<i>Inhibidor 1</i>	Humedad. Manchas claras en la zona del desespinado en todos los nopales	
	<i>Inhibidor 2</i>	Humedad. Ligeras manchas en la zona del desespinado y en la orilla	
	<i>Inhibidor 3</i>	Humedad. Ligeras manchas en la zona del desespinado y en la orilla	
Día 7	<i>Control</i>	Oscurecimiento en todas las piezas, inicia la descomposición, secreción de mucílago, humedad.	
	<i>Inhibidor 1</i>		
	<i>Inhibidor 2</i>		
	<i>Inhibidor 3</i>		

La segunda prueba de la vida de anaquel, en la que se utilizó más inhibidor (0.30 %), resultó mejor porque se detuvo la oxidación durante siete días. Los inhibidores más efectivos resultaron ser el **2** y **3** porque fueron los que conservaron por más tiempo las características visuales del nopal recién desespinado.

Utilizar el 0.30 % de inhibidor en lugar de 0.10 % (concentración a la cual ya no hay actividad enzimática (ver gráfica 4), nos indica que para detener el oscurecimiento enzimático del nopal es necesario saturar con el inhibidor para alargar un tiempo significativo su vida de anaquel. Este aumento en la concentración se debe a que los experimentos se hicieron directamente sobre un extracto semi-purificado y al hacer la vida de anaquel se hace sobre nopales enteros donde hay diversas barreras (pared celular, membrana, entre otras estructuras) que dificultan la interacción del inhibidor con la enzima. La presencia de la humedad en el empaque pudo haber sido la que aceleró la aparición de las manchas del pardeamiento; es decir, el agua es un factor que cataliza la reacción enzimática de oscurecimiento, además de que favorece la descomposición microbiana. Por esto es necesario controlar o evitar los efectos de la humedad para llegar a obtener una inhibición de más de siete días. Esto resultaría mejor para la exportación.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto del residuo del desespinado del nopal con actividad enzimática.
- El nopal solamente presenta actividad de Peroxidasa por lo que esta enzima es responsable del pardeamiento enzimático del nopal desespinado.
- El mejor método para purificar la porción proteínica del nopal fue la precipitación con sulfato de amonio mediante dos precipitaciones 35 % y 90 %.
- Los ácidos ferúlico, caféico y cumárico resultaron ser sustratos de la PO.
- El inhibidor **1** mantuvo la actividad de la PO en cero por un tiempo proporcional a la concentración a la que se agregaba.
- Los otros cinco compuestos probados inhibieron parcialmente a la PO disminuyendo su velocidad de reacción solamente.
- La menor actividad de la PO se logra a una concentración alrededor de 0.10 % de cualquiera de los inhibidores evaluados.
- El inhibidor **5** y el cacalol son buenos inhibidores de la PO del nopal pero tienen el inconveniente de que son poco solubles en agua a pH 7.
- Los mejores inhibidores de la PO fueron los compuestos **1, 2, 3 y 4**.
- La vida de anaquel que se obtuvo fue de siete días.
- Los inhibidores **2 y 3** fueron los que mantuvieron por más tiempo las características visuales del nopal desespinado por lo que se puede recomendar la utilización de éstos para evitar la rápida aparición del oscurecimiento enzimático del nopal causado por la PO.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

NORMA OFICIAL MEXICANA



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-FF-068-1988

HORTALIZA FRESCA - NOPAL VERDURA CON ESPINAS (Opuntia spp) -
ESPECIFICACIONES

FRESH VEGETABLE - PRICKLY PEAR (Opuntia spp) -
SPECIFICATIONS

DIRECCION GENERAL DE NORMAS**PREFACIO**

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes Instituciones y Organismos:

- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS

Comisión Nacional de Fruticultura.
Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal.
Dirección General de Normatividad Agrícola.
Dirección General de Organización de Productores.
Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal.
Dirección General de Control Operativo.
Dirección General de Asuntos Internacionales.
Dirección General de Desarrollo Agroindustrial.
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Delegación de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos en el Distrito Federal.
- SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
Dirección General de Fomento y Modernización del Abasto.
- FIDEICOMISO COMISION PROMOTORA PARA EL MEJORAMIENTO SOCIAL (CONASUPO).
- INSTITUTO NACIONAL DEL CONSUMIDOR.
- CONFEDERACION NACIONAL DE LA PEQUEÑA PROPIEDAD.
- BANCO NACIONAL DE CRÉDITO RURAL.
- LABORATORIOS NACIONALES DE FOMENTO INDUSTRIAL.
- CAMARA NACIONAL DE COMERCIO DE LA CIUDAD DE MÉXICO
- GIGANTE, S.A. DE C. V.
- INSTITUTO MEXICANO DE INVESTIGACIONES TECNOLOGICAS, A.C.
- PRODUCTORES DE NOPAL.

HORTALIZA FRESCA - NOPAL VERDURA CON ESPINAS (Opuntia spp) - ESPECIFICACIONES

FRESH VEGETABLE - PRICKLY PEAR (Opuntia spp) - SPECIFICATIONS

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Mexicana establece las características de calidad que debe cumplir el nopal verdura con espinas Opuntia ficus indica, Opuntia tomentosa, Opuntia hyptiacantha, Opuntia robusta, Opuntia inermis Coulter, Opuntia undulata, en estado fresco, destinado al consumo humano.

2 REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NMX-Z-012 Muestreo para la inspección por atributos.

NMX-FF-006 Productos alimenticios no industrializados para uso humano-
Fruta fresca-Terminología.

3 DEFINICION DEL PRODUCTO

Para los efectos de esta norma se entiende por nopal verdura con espinas al cladodio de la planta cultivada perteneciente a la familia de las Cactáceas, del género Opuntia y especie ficus indica, tomentosa, hyptiacantha, robusta, inermis Coulter, undulata.

4 TERMINOLOGIA

4.1 Cladodio

Es una rama de forma comprimida o hasta laminar, generalmente con hojas rudimentarias conocidas como espinas, de color verde.

4.2 Defecto menor

Es aquel que afecta realmente la apariencia, calidad de consumo o calidad de mercado del cladodio (véase Apéndice A 1)

4.3 Defecto mayor

Es aquel que afecta seriamente la apariencia, calidad de consumo o calidad de mercado del cladodio (véase Apéndice A 1).

4.4 Defecto crítico

Es aquel que afecta muy seriamente la apariencia, calidad de consumo o calidad de mercado del cladodio (véase Apéndice A 1).

4.5 Nopal en estado sazón

Es aquel que presenta una coloración verde claro brillante en toda su superficie.

4.6 Para otros términos y definiciones relacionados con esta norma debe consultarse la NMX-FF-006 (véase Capítulo 2).

5 CLASIFICACION Y DESIGNACION DEL PRODUCTO

5.1 Clasificación

El nopal verdura con espinas se clasifica por tamaño y calidad.

5.1.1 Tamaño

Esta se realiza en función de su longitud de acuerdo al Cuadro 1.

CUADRO 1 Clasificación por tamaño en función de la longitud para nopal verdura con espinas

Tamaño	Longitud (cm)
A	25-30.0
B	21-24.9
C	17-20.9
D	13-16.9
E	9-12.9

5.1.2 Calidad

Se efectúa en función de sus especificaciones en tres grados de calidad, en orden descendente: México extra, México 1 y México 2.

5.2 Designación del producto

5.2.1 El nopal verdura con espinas se designa por su nombre, especie, variedad, tamaño y grado de calidad.

5.2.2 El producto que no cumpla con los requisitos que establece la calidad México 2, se considera "Fuera de Norma"

5.2.3 Un lote que no ha sido inspeccionado, se le designa como "No clasificado".

6 ESPECIFICACIONES

El producto objeto de esta norma en sus diferentes grados de calidad debe cumplir con las siguientes:

6.1 Especificaciones sensoriales.

Los nopales deben:

6.1.1 Ser frescos, limpios, sanos, enteros y bien formados.

6.1.2 Tener sabor y olor característico de la especie y variedad.

6.1.3 Tener consistencia firme.

6.1.4 Estar exentos de humedad exterior anormal.

6.1.5 Estar prácticamente libres de defectos de origen mecánico, entomológico, microbiológico, meteorológico, genético - fisiológico u otros.

6.1.6 Estar prácticamente libres de descomposición o pudrición.

6.1.7 Presentar una coloración verde claro brillante en toda su superficie.

6.2 Especificaciones físicas

6.2.1 Los nopales con espinas, calidad México extra, México 1 o México 2, pueden presentar cualquiera de los tamaños de acuerdo al Cuadro 1.

6.3 Especificaciones de madurez

Los nopales deben presentar el estado sazón.

6.4 Especificaciones de defectos

Los nopales se clasifican con base en los defectos de acuerdo al Cuadro 2.

CUADRO 2 **ESPECIFICACIONES DE DEFECTOS**

Tipo de defecto	Calidad		
	México extra	México 1	México 2
Menor	No se permite	Se permite	Se permite
Mayor	No se permite	No se permite	Se permite
Critico	No se permite	No se permite	No se permite

6.5 Especificaciones de presentación

Los nopales con espinas deben presentar un aspecto uniforme en cuanto a madurez y tamaño.

6.6 Tolerancias

Para las especificaciones físicas y de defectos, en los distintos grados de calidad, se permiten las tolerancias que se presentan en el Cuadro 3.

CUADRO 3 Tolerancias para las especificaciones físicas y de defectos

Especificaciones	Tolerancias (%)					
	México extra		México 1		México 2	
	p.e.	p.a.	p.e.	p.a.	p.e.	p.a.
Físicas (tamaño)	5	5	10	10	15	15
Defecto menor	10	12	s.p.	s.p.	s.p.	s.p.
Defecto mayor	6	7	10	12	s.p.	s.p.
Defecto critico	4	5	6	7	10	12
Total de defectos permitidos	10	12	10	12	10	12

p.e.: Punto de embarque

p.a.: Punto de arribo

s.p.: Se permite.

6.6.1 En un lote de nopal con espinas se permite en punto de embarque de 0 a 0.5 % de producto con pudrición visible y en punto de arribo 1 %.

6.6.2 En las tolerancias de las especificaciones físicas y de defectos, se da el porcentaje permitido para el lote. En nopal con espinas aquél que no corresponda a la designación declarada se evalúa por conteo.

NOTA: Residuos tóxicos. Están sujetos a las tolerancias establecidas por las Secretarías de Agricultura y Recursos Hidráulicos y la de Salud incluyendo aquellos correspondientes a los residuos de plaguicidas, productos mejoradores de la apariencia y otros.

7 MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA

El muestro del producto puede establecerse de conformidad entre vendedor y comprador; a falta de ésta, se debe llevar a cabo de acuerdo con las descripciones indicadas en la NMX-Z-012 (véase Capítulo 2).

8 MÉTODO DE PRUEBA

Para verificar si un lote cumple con la especificación física establecida en esta norma la determinación correspondiente debe realizarse de acuerdo al procedimiento establecido en el apéndice A 2 (véase Apéndice A 2).

9 MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE Y EMBALAJE

9.1 Marcado y Etiquetado

Cada envase debe llevar en el exterior una etiqueta o impresión permanente con caracteres legibles e indeleble redactados en español que tenga como mínimo los datos siguientes:

- Nopal verdura con espinas en estado fresco, especie y variedad.
- Identificación simbólica del nopal verdura con espinas en estado fresco.
- Marca o identificación simbólica del productor o envasador.
- Nombre y dirección del productor, distribuidor o exportador, y cuando se requiera el del importador.
- Zona regional de producción y la leyenda "Producto de México".
- Fecha de envasado.
- Designación del producto
- Contenido neto en kilogramos al envasar

NOTA: Todos los textos anteriores pueden figurar en otro idioma cuando el producto es para exportación y el importador lo requiera.

9.2 Envase y embalaje

9.2.1 Envasado y presentación

El acomodo de los nopales dentro de cada envase debe hacerse de acuerdo al Manual técnico de prácticas recomendadas para la cosecha, acondicionamiento y transporte de nopal verdura con espinas en estado fresco (véase Capítulo 11).

9.2.2 Características de los envases

Las características de los envases, establecidas en esta sección son de carácter general.

9.2.2.1 Los envases deben reunir las características de calidad, de higiene, ventilación y resistencia que garanticen el manejo, transporte y conservación del producto.

9.2.2.2 Los envases pueden ser de cualquier material adecuado y conveniente, de las dimensiones que se adapten a las necesidades de transportación nacional e internacional, según el caso.

9.2.2.3 Los envases que se utilizan comúnmente para comercializar los nopales verdura con espinas se enlistan en el cuadro 4.

CUADRO 4 Envases utilizados comúnmente para nopal verdura con espinas

Tipo de envase	Material	Masa del producto por envase (kg)
CANASTA	CARRIZO	5
CANASTA	MIMBRE	25
CANASTA	MIMBRE	10
REJA	MADERA	30
CAJA	PLASTICO	30
*PACAS	YUTE	330

* En este caso sólo se cubre la base y parte superior de la misma

10 APENDICE A 1

Ver cuadro de clasificación de defectos.

11 BIBLIOGRAFIA

- a) Comisión Nacional de Fruticultura, Departamento de Normalización Control de Calidad e Inspección. 1988. Manual técnico de prácticas recomendadas para la cosecha, acondicionamiento y transporte de nopal verdura con espinas en estado fresco.
- b) Delegaciones estatales de la Comisión Nacional de Fruticultura. 1987. Aspectos técnicos del nopal
- c) Delegación SARH en el Distrito Federal. 1987. Aspectos técnicos del nopal.
- d) Departamento de extensión agrícola. 1969. Cultivo y aprovechamiento del nopal. Chapingo, México.
- e) García Mayoral, Tito. 1965 Problemas entomológicos del nopal en el valle de México. Chapingo, México.
- f) García V., Armando. 1972. Cultivo de nopal verdura. Chapingo, México.

g) Grajeda Gómez, Juan Enrique. 1978 Influencia de la poda sobre la producción intensiva del nopal verdura *Opuntia spp* y su relación con la tasa de asimilación neta. Chapingo, México.

h) SECOFI - Dirección General de Normas 1977. Guía para la redacción estructuración y presentación de las Normas Mexicanas NMX-Z-013.

i) Pimiento Barrios, Eulogio 1974. Estudio de las causas que producen engrosamiento de cladodios en nopal *Oremitia spp* en la zona de Chapingo, México. Chapingo, México.

j) Tosco, Uberto. Instituto Geográfico de Agostini 1973. Diccionario de botánica. Ed. Teide. Barcelona.

12 APENDICE A 2

Determinación del tamaño para nopal verdura con espinas con base en su longitud.

APÉNDICE A 1 Clasificación de defectos en función de su origen e incidencia en la hortaliza

- Cochinilla <i>Dactylopius coccus</i> Costa	Cuando el insecto invade una superficie menor del 5%.	Cuando el insecto invade una superficie del 5% hasta 10%.	Cuando existe una superficie mayor del 10% invadida por el insecto.
-Perforaciones por pájaros	Cuando son superficiales y afectan un área hasta del 5%.	Cuando afectan un área mayor del 5% y hasta 1% de la superficie.	Cuando son profundas y/o afectan un área mayor del 10% de la superficie.
MICROBIOLOGICO			
- Pudrición blanda <i>Xanthomonas sp</i>			Independientemente del tamaño, se considera defecto crítico.
- Engrosamiento de cladodio microorganismo no identificado	Cuando presenta ligeros engrosamientos que afectan parcialmente la forma y calidad.	Cuando presenta engrosamientos que afectan seriamente la apariencia y calidad.	Cuando presenta engrosamientos que afectan muy seriamente la apariencia y calidad.
METEOROLOGICO			
- Daños por granizo	Cuando afecta un área mayor del 3% y hasta 7% de la superficie.	Cuando afecta un área mayor del 7% y hasta 12% de la superficie.	Cuando afecta un área mayor del 12% de la superficie.
- Daños por heladas			
GENETICO-FISIOLOGICO			
- Deformación	Cuando se altera ligeramente la forma característica.	Cuando se altera la forma característica y se afecta seriamente la apariencia.	Cuando esta muy alterada la forma característica y afecta muy seriamente la apariencia.

MECANICO - Magulladuras	Cuando cubran un área hasta del 5% de la superficie.	Cuando cubran un área mayor del 5% y hasta 10% de la superficie.	Cuando cubran un área mayor del 10% de la superficie.
----------------------------	--	--	---

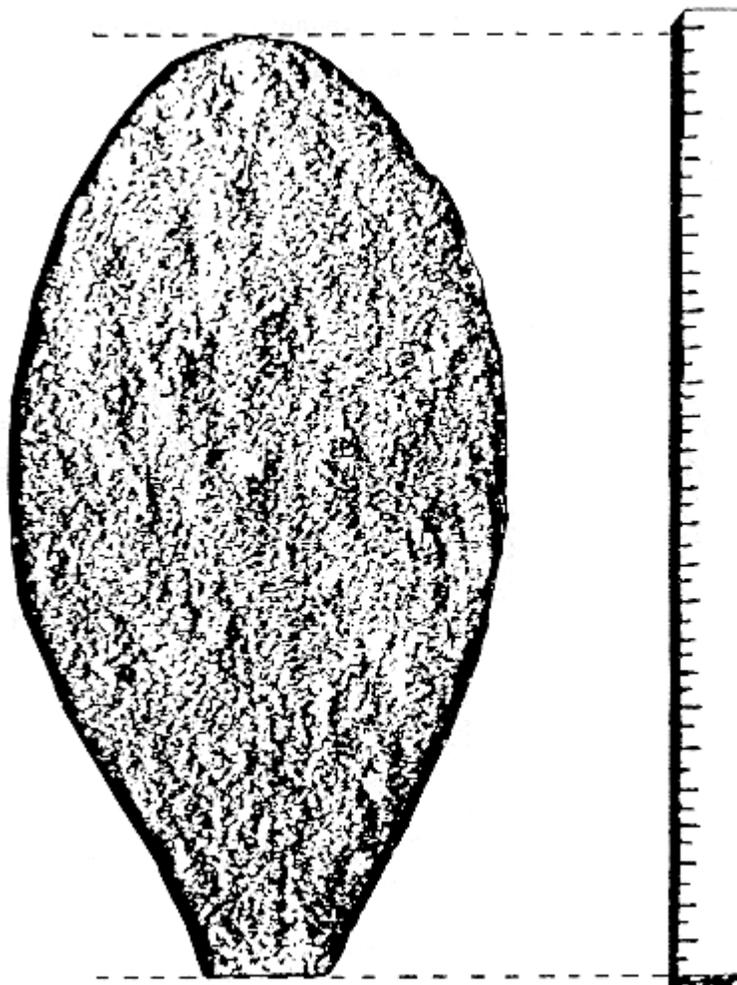


Fig. 1. DETERMINACION DEL TAMAÑO PARA NOPAL VERDURA CON ESPINAS CON BASE EN SU LONGITUD

12.1 Material y equipo

Regla o cinta métrica.

12.2 Procedimiento

Colocar el instrumento de medición sobre una superficie horizontal y plana y sobre ésta el cladodio. Determinar su longitud tomando la lectura directamente, como se indica en la Figura 1.

12.3 Expresión de resultados

Los resultados se deben expresar en centímetros (cm).

12.4 Informe de la prueba

El resultado final de la determinación será la media aritmética de las mediciones realizadas.

EL DIRECTOR GENERAL DE LA COMISION NACIONAL DE FRUTICULTURA DE LA
SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRÁULICOS



LIC. FRANCISCO J. MARQUEZ AGUILAR

EL DIRECTOR GENERAL DE POLITICA Y DESARROLLO AGROPECUARIO Y
FORESTAL DE LA SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.



ING. ERNESTO BADILLO NAVARRETE

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS DE LA SECRETARIA DE COMERCIO
Y FOMENTO INDUSTRIAL



LIC. CONSUELO SAEZ PUEYO

9.2 ANEXO 2

CODEX ALIMENTARIUS

NORMA DEL CODEX PARA EL NOPAL

CODEX STAN 185-1993

1. DEFINICION DEL PRODUCTO

Esta norma se aplica al tallo modificado de las variedades comerciales de nopales obtenidos de *Opuntia ficus indica*, *O. tomentosa*, *O. hyptiacantha*, *O. robusta*, *O. inermis*, *O. undulata*, de la familia de las *Cactaceae*, que habrán de suministrarse frescos al consumidor, después de su acondicionamiento y envasado. Se excluyen los nopales destinados a la elaboración industrial. 1

2. DISPOSICIONES RELATIVAS A LA CALIDAD

2.1 REQUISITOS MINIMOS

En todas las categorías, de conformidad con las disposiciones especiales para cada categoría y las tolerancias permitidas, los nopales deberán:

- estar enteros;
- ser de consistencia firme;
- estar sanos, deberán excluirse los productos afectados por podredumbre o deterioro que haga que no sean aptos para el consumo;
- estar exentos de espinas;
- estar limpios y prácticamente exentos de cualquier materia extraña visible;
- estar prácticamente exentos de daños causados por plagas;
- estar exentos de manchas pronunciadas;
- estar exentos de daños causados por bajas temperaturas;

-
- estar exentos de humedad externa anormal, salvo la condensación consiguiente a su remoción de una cámara frigorífica;
 - estar exentos de cualquier olor y/o sabor extraños;
 - estar suficientemente desarrollados y presentar un grado de madurez satisfactorio según la naturaleza del producto;
 - presentar la forma, color, sabor y olor característicos de la especie.

2.1.1 El desarrollo y condición de los nopales deberán ser tales que les permitan:

- soportar el transporte y la manipulación, y
- llegar en estado satisfactorio al lugar de destino.

2.2 CLASIFICACION

Los nopales se clasifican en tres categorías, según se definen a continuación:

2.2.1 Categoría “Extra”

Los nopales de esta categoría deberán ser de calidad superior y característicos de la variedad y/o tipo comercial. No deberán tener defectos, salvo defectos superficiales muy leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase.

2.2.2 Categoría I

Los nopales de esta categoría deberán ser de buena calidad y característicos de la variedad y/o tipo comercial. Podrán permitirse, sin embargo, los siguientes defectos leves, siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase:

- defectos leves de forma y color;

- defectos leves de la piel debidos a magulladuras, cicatrices, costras, manchas u otros defectos superficiales. La superficie total afectada no deberá superar el 5 por ciento.

2.2.3 Categoría II

Esta categoría comprende los nopales que no pueden clasificarse en las categorías superiores, pero satisfacen los requisitos mínimos especificados en la Sección 2.1. Los nopales de esta categoría deberán ser característicos de la variedad y/o tipo comercial. Podrán permitirse los siguientes defectos, siempre y cuando las nopales conserven sus características esenciales en lo que respecta a su calidad, estado de conservación y presentación:

- defectos de forma y color, siempre y cuando el producto tenga las características propias del nopal;
- defectos de la piel debidos a magulladuras, cicatrices, costras, manchas u otros defectos. La superficie total afectada no deberá superar el 10 por ciento.

3. DISPOSICIONES SOBRE LA CLASIFICACIÓN POR CALIBRES

El calibre se determina por la longitud del nopal, de acuerdo con la siguiente tabla:

Código de Calibre	Longitud (centímetros)
A	9-13
B	13-17
C	17-21
D	21-25
E	25-30

4. DISPOSICIONES SOBRE TOLERANCIAS

En cada envase se permitirán tolerancias de calidad y calibre para los productos que no satisfagan los requisitos de la categoría indicada.

4.1 TOLERANCIAS DE CALIDAD

4.1.1 Categoría “Extra”

Cinco por ciento, en número o en peso, de los nopales que no satisfagan los requisitos de esta categoría, pero satisfagan los de la Categoría I o, excepcionalmente, que no superen las tolerancias establecidas para esta última.

4.1.2 Categoría I

Diez por ciento, en número o en peso, de los nopales que no satisfagan los requisitos de esta categoría, pero satisfagan los de la Categoría II o, excepcionalmente, que no superen las tolerancias establecidas para esta última.

4.1.3 Categoría II

Diez por ciento, en número o en peso, de los nopales que no satisfagan los requisitos de esta categoría ni los requisitos mínimos, con excepción de los productos afectados por podredumbre, irregularidades pronunciadas o cualquier otro tipo de deterioro que haga que no sean aptos para el consumo.

4.2 TOLERANCIAS DE CALIBRE

Cinco por ciento para la categoría “Extra” y 10 por ciento para las Categorías I ó II; en número o en peso, de los nopales que no satisfagan los requisitos relativos al calibre, pero que entren en la categoría inmediatamente superior y/o inferior a las indicadas en la Sección 3.

5. DISPOSICIONES SOBRE LA PRESENTACION

5.1 HOMOGENEIDAD

El contenido de cada envase (o lote, para productos presentados a granel) deberá ser homogéneo y estar constituido únicamente por nopales del mismo origen, variedad, calidad y calibre. Para la Categoría “Extra”, el color y la madurez deberán ser homogéneos. La parte visible del contenido del envase (o lote, para productos presentados a granel) deberá ser representativa de todo el contenido.

5.2 ENVASADO

Los nopales deberán envasarse de tal manera que el producto quede debidamente protegido. Los materiales utilizados en el interior del envase deberán ser nuevos, estar limpios y ser de calidad tal que evite cualquier daño externo o interno al producto. Se permite el uso de materiales, en particular papel o sellos con indicaciones comerciales, siempre y cuando estén impresos o etiquetados con tinta o pegamento no tóxico.

Los nopales deberán disponerse en envases que se ajusten al Código Internacional de Prácticas Recomendado para el Envasado y Transporte de Frutas y Hortalizas Frescas (CAC/RCP 44-1995).

5.2.1 Descripción de los Envases

Los envases deberán satisfacer las características de calidad, higiene, ventilación y resistencia necesarias para asegurar una manipulación, transporte y conservación apropiados de los nopales.

Los envases (o lote, para productos presentados a granel) deberán estar exentos de cualquier materia y olor extraños.

6. MERCADO O ETIQUETADO

6.1 ENVASES DESTINADOS AL CONSUMIDOR

Además de los requisitos de la Norma General del Codex para el Etiquetado de Alimentos Preenvasados (CODEX STAN 1-1985, Rev. 2-1999), se aplican las siguientes disposiciones específicas:

6.1.1 Naturaleza del Producto

Si el producto no es visible desde el exterior, cada envase deberá etiquetarse con el nombre del producto y, facultativamente, con el de la variedad.

6.2 ENVASES NO DESTINADOS A LA VENTA AL POR MENOR

Cada envase deberá llevar las siguientes indicaciones en letras agrupadas en el mismo lado, marcadas de forma legible e indeleble y visibles desde el exterior, o bien en los documentos que acompañan al embarque.³ Para los productos transportados a granel, estas indicaciones deberán aparecer en el documento que acompaña a la mercancía.

6.2.1 Identificación

Nombre y dirección del Exportador, Envasador y/o Expedidor. Código de identificación (facultativo).⁴

6.2.2 Naturaleza del Producto

Nombre del producto si el contenido no es visible desde el exterior. Nombre de la variedad y/o tipo comercial (facultativo).

6.2.3 Origen del Producto

País de origen y, facultativamente, nombre del lugar, distrito o región de producción.

6.2.4 Identificación Comercial

- Categoría;

- Calibre (código de calibre o gama de longitud en centímetros);
- Número de unidades (facultativo);
- Peso neto (facultativo).

6.2.5 Marca de Inspección Oficial (facultativo)

7. CONTAMINANTES

7.1 METALES PESADOS

Los nopales deberán ajustarse a los niveles máximos para metales pesados establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius para este producto.

7.2 RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

Los nopales deberán ajustarse a los límites máximos para residuos establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius para este producto.

8. HIGIENE

8.1 Se recomienda que los productos regulados por las disposiciones de la presente norma se preparen y manipulen de conformidad con las secciones apropiadas del Código Internacional Recomendado de Prácticas - Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997), y otros textos del Codees pertinentes, como los Códigos de Prácticas y Códigos de Prácticas de Higiene.

8.2 Los productos deberán cumplir los requisitos microbiológicos establecidos de acuerdo con los Principios para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos a los Alimentos (CAC/GL 21-1997).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Badui, Salvador. (1996). *Química de Alimentos*, 3ª ed. México. Editorial Alhambra Mexicana, 310-314, 298, 299.
2. Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q., Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, (en línea, disponible en www.elsevier.com; internet; accesado 20 junio 2002,)
3. Billot, Jean. (2002). “El pardeamiento enzimático,” en *Tecnología de las Hortalizas*, Ed. Yves, Tiril (Zaragoza: Acribia), pp. 233 – 251.
4. Castillo, José Miguel. “Primer informe para el Desarrollo de un Proceso para la Inhibición del Pardeamiento Enzimático en Nopales Frescos” (manuscrito no publicado, Facultad de Química, UNAM. México, 2004)
5. Clyde, Stauffer. (1989). *Enzyme assays for food scientists*, (Nueva York: Van Nostrand Reinhold), pp. 202-217.
6. Coultate. (1998). *Manual de química y bioquímica de los alimentos*, (Zaragoza: Acribia), pp. 157-161.
7. El Nopal en *Claridades* de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) Num. 98 (en línea, disponible en infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/098/ca098.pdf; Internet; accesado el 1 de octubre de 2005.
8. El Nopal, (en línea, disponible en www_giga_com--mag-Tratado%20Nopal_htm; internet; accesado 21 junio 2004)
9. Fennema, Owen. (1993). *Química de los Alimentos*, (Zaragoza: Acribia) pp. 501 – 509.

10. Flores, Claudio, Luna, Juan, Ramírez, Pedro. Mercado Mundial del nopalito en línea, disponible en www.infoaserca.gob.mx/proafex/NOPAL.pdf
11. Furia, Thomas. (1975). Handbook of food additives, (E.U.A.: CRC Press.), pp. 41, 42.
12. González, Julio César, Navarro, Arturo, Jiménez, Manuel, Gómez, Virginia. (2005). “Pruebas de actividad antioxidante del cacalol y sus derivados alquilados” Cartel en Simposio Interno del Instituto de Química, UNAM.
13. Gundogmaz, G. (2003). “Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from Various Salvia Species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. And *Salvia tomentosa* Miller)” en *Food Science Technology*, (Mayo), pp. 309-315.
14. Heid, J. L. (1963). Food processing Operations, Vol. 2. (Inglaterra), pp. 253.
15. Iborra, José. “Cálculo de los parámetros cinéticos y de inhibición de una enzima.” en Prácticas de Bioquímica (en línea, disponible en www.um.es/bbmbi/AyudasDocentes/Libros/Quimica/Practicas%20de%20Bioquimica.htm)
16. INE, Instituto Nacional de Ecología, (2004) Nopal Verdura, (en línea, disponible en www.ine.gob.com.mx; internet; accesado el 21 junio 2004)
17. Lambrecht, H. S. (1995). “Sulfites substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods,” *Enzymatic Browning and its Prevention*, (American Chemical Society), pp. 313-323.
18. Miller, Dennis. (1998). Food Chemistry, a Laboratory Manual, (E.U.A.: John Wiley & Sons), pp. 44-56.
19. NMX-FF-068-1988 Hortaliza Fresca - Nopal Verdura con espinas (*Opuntia* spp) – Especificaciones; (en línea, disponible en www.economia-noms.gob.mx)
20. Norma del Codex para el Nopal. CODEX STAN 185-1993 (en línea, disponible en http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)

21. Padiglia, Alessandra. (1995). "Purification and Characterization of *Opuntia* Peroxidase" en *Phytochemistry* (Vol 38, No. 2), pp. 295-297.
22. Ponce, A. G., Roura, S., Del Valle, C. (2003). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables, (en línea, disponible en www.elsevier.com; internet; publicado el 17 julio 2003)
23. Propiedades Generales y Estabilidad de las Enzimas: Estudio de la Peroxidasa Láctea, publicado en línea, internet 1 septiembre 2004, disponible en www.um.es
24. Regalado, Carlos, García-Almendaráez, Blanca. Duarte-Vázquez, Miguel. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry*, pp. 243-256.
25. Sherman, T., LeGardeur, T., Lax, A. (1995). "Implications of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase in plants" en *Enzymatic Browning and its Prevention*, (American Chemical Society), pp. 103, 104.
26. Singh, Naresh.(2003) "A Method for Large Scale Purification of Turnip Peroxidase and Its Characterization" en *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol 33, No. 2), pp. 125-135.
27. Walker, J y Ferrar, P. (1995). "The Control of enzymic browning in foods," en *Chemistry & Industry*. (16 octubre 1995) pp. 836-839.
28. Walker, John. (1995). "Enzymatic browning in fruits," en *Enzymatic Browning and its Prevention*, (American Chemical Society), pp. 8-22.
29. Whitaker, John. (1972). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, (E.U.A.: Marcel Dekker), pp. 571-575, 592-600.
30. Young, Lee Mi. (1998). "Inactivation and Cleavage of Radish Peroxidase by Various Reducing Agents" en *Phytochemistry* (Vol 49, No. 1), pp. 23-27.

31. Zamora, Susana. (2004) “Alternativas para la conservación de nopal desespinado”. (Tesis de Licenciatura, UNAM), pp. 21-27, 31, 32, 34-39, 42.